Bestimmung der Immunglobulindeterminantendichte auf einzelnen menschlichen Blutlymphozyten durch quantitative mikrophotometrische Immunautoradiographie

Otto Lemmerz

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0039

Dissertationsdruckanstalt Werner Blasaditsch · Augsburger Straße 8 · 8958 Füssen/Allgäu

Aus dem Institut für Hämatologie der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
München

Bestimmung der Immunglobulindeterminantendichte auf einzelnen menschlichen Blutlymphozyten durch quantitative mikrophotometrische Immunautoradiographie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von
Otto Lemmerz
aus
Füssen-Hopfen

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Thierfelder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Herrn Prof. Dr. med. S. Thierfelder möchte ich für die Möglichkeit danken, im Institut für Hämatologie München diese Arbeit durchführen zu können. Herrn Dr. med. E. Thiel danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung während der Arbeit.
Dank schulde ich außerdem dem Labor von Dr. med. habil. M. Eulitz für die Überlassung der Antiseren, dem Labor von Dr. med. H. Grosse-Wilde für die Bereitstellung von stimulierten Zellen sowie den Mitarbeiterinnen des Labors von Dr. med. E. Thiel für ihre praktische Hilfe. Herrn W. Ruppelt sei für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Resultate gedankt.

Gewidmet

meinen Eltern

und meiner Frau Christine

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

1. Das B- und T-Zell-System S.10
2. Oberflächenimmunglobuline als Rezeptoren S.11
3. Darstellungsmethoden S.12
4. ^{125}J-Autoradiographie S.14
5. Aufgabe und Ziel der Arbeit S.14

II. Materialien

1. Spender S.16
2. Antiseren S.18
3. Zell-Linien S.19
4. Stimulierte Zellen S.20

III. Methoden

1. Präparation reiner Zellsuspensionen S.21
2. Radiojodination der Antiseren S.22
3. Markierung der Membranrezeptoren S.24
4. Herstellung des Erythrozytenstandards S.25
5. Herstellung der Autoradiogramme S.27
6. Mikrophotometrie
   a) Prinzip S.29
   b) Meßvorgang und Meßgeräte S.30
   c) Eichung des Meßstrahles S.32
   d) Untergrundmessung S.32

7. Markierungsindex S.33

8. Histogramm S.34

9. Quantifizierung von Immunglobulinmolekülen auf einzelnen Lymphozyten S.35

10. Statistische Auswertung S.37

IV. Ergebnisse

1. Ermittlung der Sättigungskonzentration von Antikörpern S.38

2. Verschiedene Expositionszeiten S.40

3. Blocking-Experiment S.42

4. Bestimmung der Bindung direkter und indirekter Antikörper S.44

5. Quantifizierung der Immunglobulindeterminanten von Lymphozyten unter Verwendung eines radiojodinierten anti IgG-Antikörpers

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen S.49

b) Markierung von Lymphozyten desselben Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten S.51

c) Versuche mit gefrorenen Zellen S.52

6. Quantifizierung der IgM-Determinanten einzelner Lymphozyten unter Verwendung eines anti IgM-Globulins

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen S.53

b) T-Zell-Linien S.55

7. Bestimmung der Bindung eines gegen IgM gerichteten Antikörperfragmentes an einzelnen Lymphozyten
   a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen S.55
   b) T-Zell-Linien S.57
   c) Bestimmung der Bindung des Antikörperfragmentes $F(ab')_2$-anti IgM an Lymphozyten mehrerer Spender bei Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten S.57
   d) Histogramm der IgM-Determinantendichte pro Lymphozyt im Blut eines Spenders (Ju) S.59
8. Quantifizierung von Leicht-Kettendeterminanten mit Hilfe eines markierten Anti-kappa-Fragmentes
   a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen S.61
   b) Histogramm der Markierungsdichte von Lymphozyten einer Normalperson(Ja) nach Inkubation mit $F(ab')_2$-anti kappa S.62
9. Markierung von Lymphozyten desselben Spenders mit verschiedenen Antikörperpräparationen S.64
10. Untersuchungen an Lymphozyten des Blutes von über 60-jährigen Spendern
   a) Antikörper: $F(ab')_2$-anti IgM S.66
   b) Antikörper: $F(ab')_2$-anti kappa S.66

c) Histogramm der Markierungsdichte von Lymphozyten eines alten Spenders (Hä, 68 Jahre) nach Markierung mit $F(ab')_2$-anti kappa S.68

11. Untersuchungen der Immunglobulindeterminanten auf stimulierten Zellen

a) Protein A - stimuliert S.70

b) ATG - stimuliert S.72

c) PHA -, Con A -, PWM - stimuliert S.73

V. Diskussion S.74

VI. Zusammenfassung S.83

VII. Literaturverzeichnis S.85

VIII. Lebenslauf S.99

ABKÜRZUNGEN

AK = Antikörper

ATG = Anti - Thymozytenglobulin

Con A = Concanavalin A

cpm = count per minute

DMSO = Dimethylsulfoxyd

HBSS = Hank's balanced salt solution

Ig = Immunglobulin

PBS = Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung

PHA = Phytohämagglutinin

PWM = Pokeweed - Mitogen

I. EINLEITUNG

1. Das B- und T-Zell-System

Die Lymphozyten stehen seit einigen Jahren im Brennpunkt des Interesses der immunologischen Forschung. Experimente mit Tieren haben deutlich gezeigt, daß das Immunsystem in zwei Komponenten geteilt werden kann: in eine humorale und in eine zelluläre. Die Antikörper, die die humorale Immunität vermitteln, werden in den B-Lymphozyten und Plasmazellen synthetisiert. Die zelluläre Immunität ist dagegen hauptsächlich durch die T-Lymphozyten verkörpert. Beide Zell-Linien entstammen jedoch der gleichen hämatopoetischen, pluripotenten Stammzelle, die im Dottersack der fetalen Leber und im Knochenmark präsent ist (71). Unter dem Einfluß des Thymus entwickelt sich die T-Zelle. Den induzierenden Einfluß für die B-Zellentwicklung, der bei den Vögeln bekanntlich von der Bursa Fabricius ausgeht und deshalb dieser Zellinie auch den Namen gegeben hat, vermuten manche Autoren beim Menschen im Knochenmark lokalisiert (1).

2. Oberflächenimmunglobuline als Rezeptoren

Seit Ehrlich (28) im Jahre 1900 vermutete, daß Zellen, die "Antitoxin" bilden, auch "Antitoxinmoleküle" als Rezeptoren an ihrer Oberfläche haben, ist die immunologische Forschung bestrebt gewesen, die Präsenz, Verteilung und Spezifität dieser Bindungsstellen nachzuweisen. Es ist heute bekannt, daß die Immunzellen durch eine Interaktion von Antigen und Antikörpermolekül zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Diese wesentliche Rolle in der Immunantwort wird membrangebundenen Rezeptoren zugeschrieben (3, 75). Übereinstimmung besteht darin, daß die Antigenrezeptoren der B-Zellen Oberflächenimmunglobuline sind (89, 80). So wurden alle bisher aus dem Serum bekannten Immunglobulinklassen auch als oberflächengebundenes Immunglobulin an B-Lymphozyten gefunden. Als häufigste Oberflächenimmunglobulinklasse wurde meist IgM (4, 34, 88, 6), von einigen Arbeitsgruppen (19, 36) auch IgG gefunden. Die Mehrheit der zirkulierenden B-Lymphozyten des Blutes scheint jedoch zwei oder mehr Oberflächenimmunglobulinklassen zu tragen (13, 5), deren Nachweis nach Seligmann (88) und Aiuti (6) nicht auf einem methodischen Irrtum beruht. Von wenigen fraglichen Ausnahmen abgesehen, trägt eine einzelne Zelle stets nur einen Leichtkettentyp - entweder Kappa oder Lambda (4, 88). 1975 konnte von Kunkel nachgewiesen werden, daß auf den B-Zellen allein die Immunglobuline IgM und IgD die Primärrezeptormoleküle

für das Antigen darstellen und zur Differenzierung dieser Zelle zu einer antikörperbildenden Zelle führen. Er konnte damit gleiche Ergebnisse von Knapp (50) und Rowe (84) bestätigen. IgG, das hauptsächliche Serum-Immunglobulin wird nach Kunkel (52) dagegen kaum an der Membran gefunden, und seine bisher berichtete Präsenz war zurückzuführen auf eine sekundäre Adsorption.
Der von Edelmann und Poulik 1961 (29) erstmals gefundene und von Porter 1966 (76) bestätigte Aufbau eines Immunglobulins aus 2 H (heavy)-und 2 L (light)-Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind, wird auch für die Oberflächenimmunglobuline angenommen. Aufgrund immunradiochemischer Befunde (58) ist zu vermuten, daß der größte Teil des Immunglobulins dabei aus der Zelle herausragt und mit den frei zugänglichen Fab-Stücken den eigentlichen Rezeptor bildet, während das untere Ende, das sogenannte Fc-Stück in der Zellmembran vergraben ist (52).

3. Darstellungsmethoden

Die Tatsache, daß die beiden antigenbindenden Fab-Stücke frei zugänglich sind, wurde schon bald für ihren Nachweis verwendet. 1965 erbrachte Sell (89) die erste indirekte Demonstration der Präsenz von Immunglobulindeterminanten auf der Mem-

bran von Lymphozyten. Nach Kontakt mit Anti-Immunglobulin- oder Anti-Allotyp-Seren vollzog sich eine Blastentransformation dieser Zellen. Eine direkte Demonstration war dann durch die Bindung von Markererythrozyten, die mit Anti-Immunglobulin-Antikörpern beladen waren(17), oder direkt mit radiomarkierten Anti-Immunglobulin-Antikörpern(48), möglich. Die Anlagerung von korpuskulären und dadurch sichtbaren Antigenen wurde von anderen Autoren (10, 15, 30, 103) zum Beweis für die Antigenbindung der Lymphozyten herangezogen. Direkt sichtbar gemacht werden konnten die Oberflächenimmunglobuline durch Immunfluoreszenzmethoden (47, 74, 79, 80), bei denen fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper an die Oberfläche von Lymphozyten angelagert wurden und im Mikroskop betrachtet werden konnten. Weitere in-vitro-Darstellungsmethoden waren die Verwendung von Antikörpern, gekoppelt mit Enzymen (61, 63, 91) und mit Isotopen (14, 20, 69). Ermöglichte die Fluoreszenzmethode eine qualitative Unterscheidung der Rezeptorzellen, so beinhaltete die Isotopenmethode die Möglichkeit, quantitative Messungen an den markierten Zellen vorzunehmen. Mit Hilfe der durch Isotope induzierten Silberkörner auf einer photographischen Schicht konnten einzelne Zellen semiquantitativ unterschieden werden. Dieses Verfahren der Autoradiographie, verbunden mit photometrischen Meßverfahren(39, 83) erwies sich nach Einführung von Standards (23) als Möglichkeit, quantitative Messungen über einzelnen Zellen vorzunehmen.

4. Die ^{125}J - Autoradiographie

Die Isotope von Jod fanden als Markierungssubstanzen für Antigene und Antikörper bereits breite Anwendung (38, 81, 9, 92, 45, 46, 64, 102). Vor allem ^{125}J hat sich wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 60 Tagen und seiner relativ niedrigenergetischen Strahlung als Markersubstanz geeignet gezeigt. Seine Verwendung hat sich auch wegen der nur kurzen Reichweite seiner Elektronen von 10-20 µ in Wasser (31) und der geringen Energie der emittierten γ-Strahlung als vorteilhaft erwiesen. Aus diesen Gründen schien es besonders für die Mikroautoradiographie geeignet (95, 96). Nach Nossal und Ada (67) können noch 10 Moleküle einer radioaktiv markierten Substanz in oder auf einer Zelle nachgewiesen werden. Diese Methode ist damit zehn- bis hunderttausendmal empfindlicher als die Immunfluoreszenztechnik. Durch Verwendung von Standardzellen bekannter Radioaktivität ließ sich die ^{125}J - Autoradiographie zu einer quantitativen Methode ausbauen (96).

5. Aufgabe und Ziel der Arbeit

Es war Aufgabe dieser Arbeit, die Bindung von ^{125}J-markierten Antiimmunglobulinseren genau definierter Spezifität an

einzelnen Lymphozyten von verschiedenen gesunden Spendern mit Hilfe der quantitativen mikrophotometrischen Immunautoradiographie (95, 96) zu untersuchen.
Da in den letzten Jahren in verschiedenen Versuchssystemen Lymphozyten von Ratten (17, 45, 46, 48, 74, 75, 89) oder Mäusen (9, 58, 69, 70, 79, 80) untersucht worden waren, erschien es von Interesse, quantitative Bestimmungen der Oberflächenimmunglobuline menschlicher B-Lymphozyten durchzuführen. Fragestellungen waren hierbei, ob sich vergleichbare Resultate zu den aus der Literatur bekanten Befunden bei Nagern ergeben, ob die Werte verschiedener Normalpersonen vergleichbar sind, ob zeitliche Schwankungen der Ig-Rezeptordichte auftreten, ob altersabhängige Unterschiede bestehen und welche Rezeptordichten bei stimulierten Zellen anzutreffen sind.

II. MATERIALIEN

1. Spender

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die aus dem Blut gewonnenen Lymphozyten von 30 verschiedenen Normalpersonen, bei denen keine Erkrankung bekannt war, verwendet. 25 Spender waren 25 bis 35 Jahre alt. Um eine eventuelle Veränderung im Alter zu erkennen, wurden auch 5 ältere Personen (zwischen 60 und 82 Jahren alt) untersucht. Da die Lymphozyten von einigen Spendern mit verschiedenen Antikörpern untersucht wurden, ergaben sich insgesamt 55 unterschiedliche Versuchsansätze (siehe Tab. 1, Spalte 1, 2 und 3).
Mit dem Antikörper IgG-anti IgG wurden 18 Testpersonen, ein Knochenmark und eine eingefrorene Zellprobe untersucht. Lymphozyten von 8 Normalpersonen sowie stimulierte Zellen und T-Zell-Linien wurden mit IgG-anti IgM markiert. Die Bindung des Antikörperfragments $F(ab')_2$-anti IgM wurde an den Lymphozyten von 18 Personen, bei stimulierten Zellen und bei 2 T-Zell-Linien studiert. Die Anzahl gebundener $F(ab')_2$-anti k-Fragmente wurde an den Lymphozyten von 9 Spendern gemessen. Von allen Versuchspersonen wurden dazu jeweils 10 ml heparinisiertes Cubitalvenenblut abgenommen.

Antikörper	Blutlymphozyten-spender	gefrorene Zellen	Knochenmark	stimulierte Zellen	T-Zell-Linien
IgG-anti IgG	18	1	1	-	-
IgG-anti IgM	8	-	-	1	1
$F(ab')_2$-anti IgM	18	-	-	1	2
$F(ab')_2$-anti k	9	-	-	-	-

Tab. 1: Übersicht über die experimentellen Versuchsansätze bei mehreren Lymphozytenspendern unter Verwendung verschiedener Antikörperreagenzien

2. Antiseren

(Reinigung von Antikörperfraktionen, Herstellung von Antikörperfragmenten)

Für die quantitative Immunautoradiographie sind nur Antiseren genau definierter Spezifität geeignet (6, 96). Die aus dem Serum von Normalpersonen gewonnenen und im Labor von Dr. med. habil. M. Eulitz (Abteilung für Immunologie des Instituts für Hämatologie, München) durch Ammoniumsulfatfällung und DEAE-Zellulose-Chromatographie präparierten Immunglobuline IgG und IgM sowie die leichte Kette Kappa eines Bence-Jones Proteins wurden als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Hierzu wurden 2 mg/ml Antigen mit Freud'schem Adjuvans an 3 getrennten Stellen subcutan injiziert. An den 3 darauffolgenden Tagen wurden je 1 mg/ml injiziert. Wöchentliche Boosterinjektionen folgten während der nächsten 3 Monate. Nach Entblutung wurde das gegen IgG gewonnene Antiserum über eine CnBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Schweden) chromatographiert, an die IgG adsorbiert war und anschließend die anti-IgG Antikörperfraktion von der Säule eluiert. Bei einigen Antikörperpräparationen wurde das IgG-Molekül durch Spaltung mit kristallinem Pepsin (66) zum $F(ab')_2$-Bruchstück abgebaut.

Auf ihre Monospezifität wurden die Antiseren mit Hilfe des Doppeldifusionstestes nach Ouchterlony und mit der Immunelektrophorese geprüft. Die immunologische Aktivität wurde durch

passive Hämagglutination (8) ermittelt. Dabei zeigte sich, daß der anti IgG-Antikörper mit IgM kreuzreagierte, was über die Reaktivität mit leichten Ketten erklärbar war. Damit stellt der hier verwendete anti IgG-Antikörper in Wirklichkeit ein polyvalentes anti-Immunglobulin-Reagens dar und wäre somit besser als anti Ig zu bezeichnen. In der vorliegenden Arbeit ist aber der Name des Serums nach dem Immunisierungsmaterial, nämlich IgG, belassen worden. Als Träger des radioaktiven ^{125}J wurde sowohl das IgG- als auch das $F(ab')_2$-Molekül verwendet.

3. Zell-Linien

Als negative Kontrollgruppe wurden die beiden T-Zell-Linien Jurkat und T-Molt, welche von Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie vom T-Zelltyp etabliert wurden (62, 86), an verschiedenen Tagen mit in die Versuche übernommen und in derselben Weise behandelt wie die Lymphozyten der Normalpersonen.

4. Stimulierte Zellen

Periphere Blutlymphozyten von Normalpersonen, die im Labor von Dr. med. H. Grosse-Wilde (Institut für Hämatologie, München) 3 Tage in vitro mit den Mitogenen PHA (Phytohämagglutinin), Con A (Concanavalin A) oder PWM (Pokeweed Mitogen) bzw. mit Protein A von Staphylococcus aureus oder mit ATG stimuliert worden waren, wurden nach ihrer Blastentransformation ebenfalls mit radiojodinierten Antiseren inkubiert und autoradiographiert.

III. METHODEN

1. Präparation reiner Zellsuspensionen

Für die Versuche war es erforderlich, möglichst reine Lymphozytensuspensionen aus dem peripheren Blut zu gewinnen. Von verschiedenen Normalpersonen wurden jeweils 10 ml venöses Blut abgenommen, das mit 0,1 ml Heparin von 5000 IE/ml Einheiten ungerinnbar gemacht wurde. Die Verarbeitung im Labor erfolgte stets unmittelbar nach Abnahme.
10 ml Ficoll-Isopaque-Lösung wurden dazu mit 10 ml Blut überschichtet und für 10 min. bei 2500 Upm. gradientenzentrifugiert, wie von Böyum (11) beschrieben. Bei der Zentrifugation bildeten sich 4 Schichten: die obere bestand aus Plasma; darunter befand sich ein schmaler Ring mit mononukleären Zellen, der über der dritten Schicht, der Isopaque-Ficoll-Lösung schwamm. Am Boden des Zentrifugenglases war das Sediment mit den Erythrozyten und Granulozyten. Die sich in einem Ring an der Interphase darstellenden mononukleären Zellen wurden mit einer Pasteur-Pipette aspiriert, welche vorsichtig durch das Plasma bis zu dieser Schicht vorgeführt wurde.
Die Zellen wurden in der Neubauer-Kammer ausgezählt und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/20 µl HBSS eingestellt. Für

den nächsten Verarbeitungsschritt der Zellmarkierung wurden je 10^6 Zellen pro Ansatz 30 min. bei 4^oC mit den entsprechenden Antiseren inkubiert.
Sämtliche Vorgänge wurden in mit Eis gekühlten Medien bei $0-4^oC$ durchgeführt.

2. Radiojodination der Antiseren

Der Vorgang der Radiojodination stellt eine Substitution des Radioisotops ^{125}J an Tyrosin-Gruppen von Proteinen dar (43). Bis zur Jodination erfolgte die Lagerung der oben beschriebenen Antikörperfraktionen im Kühlschrank bei -20^oC. Nach Erreichen der Zimmertemperatur wurde die Markierung mit trägerfreiem $Na^{125}J$ (Farbwerke Hoechst AG) nach einer Modifikation der Chloramin-T-Methode (38, 60) vorgenommen. Chloramin-T stellte dabei das oxydierende Agens dar, welches Jodid zu atomarem Jod umwandelt. Es wurden geringere Chloramin-T-Konzentrationen und eine längere Reaktionszeit angewandt, um eine ausreichende Jodination zu erreichen und Denaturierung der Antikörper zu vermeiden (95). Die gesamte Jodination dauerte 10 min. bei Zimmertemperatur in Volumina bis 1,0 ml (89). Pro mg IgG wurden 1-3 mCi ^{125}J verwendet. Auf einem Rüttler wurden alle 30 sec. 10 ul 0,1 %iges Chloramin-T zugegeben, um die Reaktion zu starten (100 µg Chloramin-T waren in 100 µl Aqua dest

gelöst). Insgesamt erfolgte 10 x die Zugabe von je 10 µl Chloramin-T. Nach weiteren 5 min. wurden unter ständigem Schütteln insgesamt 50 µl 0,2 %iges Natriumdisulfit zugegeben, um die Reaktion zu stoppen.

Die Abtrennung des nicht-proteingebundenen Jodids erfolgte anschließend durch Gelfiltration über einer Sephadex G-25-Säule (Pharmacia-Schweden), die vorher mit 2 Tropfen 30 %-igem BSA (bovine serum albumin) vorgesättigt wurde.

Nach Auftragen des Reaktionsgemisches wurde die Säulenelution mit Fraktionierung über ca. 2 Stunden mit einem 0,1 molaren Phosphatpuffer (KH_2PO_4/K_2HPO_4) durchgeführt. Ein Fraktionssammler wurde dabei so eingestellt, daß sich das Eluat auf 30 Fraktionen zu je 1 ml verteilte.

Nach Thiel et al. (93) wird bei dieser Art der Jodination ein Markierungsgrad von 2,5-3,5 µCi/µg Ig oder annähernd 0,3 Atome ^{125}J pro IgG-Molekül erreicht (wenn 5 mCi Jod-125 pro mg Protein verwendet werden), was einer ^{125}J-Aufnahme von 50-60 % entspricht.

Zur Identifizierung der Antikörper-Fraktionen wurden 10 µl-Proben aller Fraktionen im Gamma-Counter (Packhard, USA) ausgezählt. Die Proben mit der höchsten Radioaktivität, die ja dem Proteinpeak entsprachen, wurden anschließend zusammengeschüttet. Die Volumenbestimmung zusammen mit der Konzentrationsmessung des eluierten Proteins gab Auskunft darüber, wieviel markiertes Protein vorlag.

Die Immunglobulinkonzentration wurde photometrisch im Zeiss-Photometer (BRD) bei 280 nm bestimmt. Die Eichung wurde dabei

mit PBS vorgenommen. Der jeweilige Extinktionskoeffizient für den gemessenen Antikörper bei 280 nm ermöglichte dann die Berechnung der erzielten Konzentration. Die noch vorhandene immunologische Aktivität des jodinierten Antikörpers wurde durch passive Hämagglutination überprüft. Die immunologische Wirksamkeit des jodinierten Antikörpers war unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nach der Jodination noch gleich der des nicht jodinierten (96). Um das Entflüchten von Jod-Radioaktivität zu verringern (radioaktive escape) und um die Selbstbestrahlung der Antikörpermoleküle zu reduzieren, wurde zum Schluß BSA und Natriumazid zugegeben. Letzteres diente zur Erhaltung der Keimfreiheit der Seren sowie zur Verhinderung membrandynamischer Vorgänge bei der Zellmarkierung (93).

3. Markierung der Membranrezeptoren

0,02 ml Zellsuspension, die auf eine Zellzahl von $5x10^7$ ml HBSS eingestellt war, wurde mit 0,02 ml der für den jeweiligen Versuch vorgesehenen Antiserum-Verdünnung von bekannter Antikörperkonzentration vermischt. Die Inkubation erfolgte für 30 min. bei 0-4°C, um membrandynamische Vorgänge und somit Verluste der markierten Antiserum-Oberflächenimmunglobulin -Komplexe zu vermeiden (93, 49, 56, 41). Außerdem ent-

hielten die Seren sowie Medien zur Zellwaschung Natriumazid, welches diese Membrandynamik blockiert (93).
Im Anschluß an die Inkubation wurde das Gemisch 5 x mit PBS, 0,2 %igem Natriumazid und 6 %igem Kälberserum bei dazwischengeschaltetem Gefäßwechsel gewaschen. Die Meßung der erzielten Radioaktivität der Ansätze erfolgte zum Schluß im Gamma-Counter (Packard, USA).

4. Herstellung des Erythrozytenstandards

Um die Radioaktivität, die der markierte Lymphozyt nach der Markierung mit radiojodinierten Antikörpern trägt, quantifizieren zu können, wurde auf jedem Autoradiogramm ein radioaktiv markierter Standard von bekannter Aktivität mitexponiert (57, 87, 23, 96).
Nach von Thiel et al. (96) durchgeführten Untersuchungen haben sich für die quantitative ^{125}J-Autoradiographie Erythrozyten mit einem Markierungsgrad von $5x10^{-5}\mu Ci$/Zelle als geeignet erwiesen, wenn die Autoradiogramme 4-5 Tage exponiert werden. Die Herstellung der Standarderythrozyten erfolgte wie von Thiel et al. (96) beschrieben: Humanerythrozyten wurden 6 mal in HBSS gewaschen. Anschließend wurde eine 1 %ige Suspension mit einer Zellkonzentration von $70-80x10^6$ Erythrozyten pro ml angesetzt und 100 µg Lactoperoxidase (Beecham, USA) für

je 1 ml der Suspension beigegeben.

Die Jodination erfolgte dann durch Zugabe von 200 oder 400 µCi ^{125}J und 3x20 µl frisch angesetztem 0,03 %igem H_2O_2. Für 10 min. wurde die Suspension bei Raumtemperatur geschüttelt. Gestoppt wurde die Reaktion mit 0,5 ml eisgekühltem 0,025 molarem Natriumazid in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml einer 1,5 %igen Glutaraldehydlösung fixiert. Die Suspension wurde dabei 1/2 Stunde auf dem Rüttler in Bewegung gehalten. Anschließend wurde nochmals 2 mal gewaschen.

Eine Aufbewahrung der jodinierten Erythrozyten war in PBS und 10^{-5} molarem Merthiolat bei 4°C für 6-8 Wochen möglich.

Um die Zellkonzentration zu ermitteln, wurde ein nicht jodinierter, kalter Kontrollansatz, der identisch behandelt wurde, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Im Gamma-Counter (Packhard, USA) wurde die Radioaktivität, die in 20 µl-Proben der Standardzellsuspension enthalten war, bestimmt. Aus der Gesamtradioaktivität und der Zahl der Standardzellen ließ sich dann die spezifische Aktivität eines Erythrozyten errechnen.

Mit einer Zytozentrifuge wurden auf jedes Autoradiogramm 10 µl Zellsuspension mit 200 µl PBS aufgebracht. Dieses Areal wurde anschließend mit einem Diamantschreiber gekennzeichnet.

5. Herstellung der Autoradiogramme

Alle Autoradiogramme einer Versuchsreihe wurden identisch und zugleich behandelt. Pro Antikörperverdünnung wurden jeweils 2 Präparate hergestellt. Auf einer Hälfte des Objektträgers wurde die Lymphozyten-Zellsuspension gleichmäßig ausgestrichen oder mit einer Zytozentrifuge (Shandon, GB) aufgetragen, auf der anderen Hälfte wurde stets der Erythrozyten-Standard mit der Zytozentrifuge aufgetragen. Dabei wurden 10 µl der 1 %igen Zellsuspension, die mit PBS auf 0,2 ml verdünnt wurde, 5 min. bei 800 Upm. zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet. Zur Vermeidung von Chemographieeffekten (23) wurden die Präparate mindestens 24 Stunden in Methanol fixiert.

Da zur quantitativen Autoradiographie Photoemulsionen mit einheitlicher Schichtdicke erforderlich sind, wurde der Eastman Kodak AR-10 Stripping-Film verwendet, der mit einheitlich 5 µ Schichtdicke diese Forderung erfüllt (22, 82). Schmid (85) und Ritts (82) haben genaue Beschreibungen dieser sog. Stripping-Methode veröffentlicht. Hiernach ist das Arbeiten bei Rotlicht notwendig, Neonlicht muß mindestens 1/2 Stunde zuvor ausgeschaltet sein. Es darf kein fluoreszierender Gegenstand im Raum sein.

Die Objektträger wurden, um ein sicheres Haften des Filmes zu gewährleisten, an den Kanten und auf der Rückseite mit 0,5 %iger Gelantinelösung bestrichen. Da die Emulsion des

Filmes nicht geschützt ist, muß mit großer Sorgfalt ein Berühren und Kratzen an der Oberfläche vermieden werden. Der Stripping-Film wurde mit der Schichtseite nach oben in eine Glasschüssel mit 70 %igem Äthanol gelegt, um eine gute Schneidbarkeit der Emulsionsschicht zu erreichen. Nach 6 min. wurde der Film herausgenommen und geschnitten. Er muß in seiner Größe den Objektträger gut überlappen. Zum Entwässern wurde er dann für 6 min. in 100 %iges Äthanol gelegt. Zum erforderlichen Aufquellen kam er anschließend in eine Wanne mit Aqua dest.. Er wird dabei plan und fest. Nach spätestens 3 min. fing man den schwimmenden Film mit dem Objektträger auf und achtete dabei streng darauf, daß er sich nicht in Falten legte.

Die so fertig gestellten Präparate wurden nun für ca. 1 1/2 Stunden im Trockenschrank mit Föhneinstellung gestrocknet. Nach dieser Zeit wurden sie bei völliger Dunkelheit herausgenommen und in schwarzen lichtdichten Kästen, die mit Kieselgel beschickt wurden, verwahrt. Für die vorliegenden Versuche erfolgte nun für 5 Tage ihre Exposition im Eisschrank bei ca. -20°C.

Entwickelt wurden die Filme bei völliger Dunkelheit für 6 min. bei 18°C mit 4,5 g Amidol, 18 g Natriumsulfit siccum, 0,8 g 10 %iger Kaliumbromid-Lösung und 1 Liter Aqua dest.. Zeit und Temperatur mußten genau eingehalten werden, da nach Dörmer (25) die Zahl der Silberkörner stark von der Dauer und der Temperatur bei der Entwicklung abhängig ist. Fixiert wurden die Präparate unter Rotlicht-Beleuchtung für 20 min. mit 1 g

Chromalaun, 30 g Kaliumdisulfit kristallin, 300 g Natriumthiosulfat kristallin reinst und 1 Liter Aqua dest.. Eine anschließende Wässerung wurde für maximal 2 Stunden unter fließendem Leitungswasser vorgenommen. 24 Stunden wurden dann die Präparate im Schrank getrocknet.
Eine Färbung mit 20 ml einer 5 %igen Giemsa-Lösung schloß sich über 10 min an.
Auf ein erneutes Trocknen folgte nun die Einfärbung mit einer Mischung von 30 % Äthanol und 70 % Phosphatpuffer von pH 6,4 (24) bei 16°C. Die optimale Färbung wurde nach Dörmer und Brinkmann (23) mikroskopisch ermittelt. Zum Schluß wurden die überlappenden Filmreste von der Objektträgerrückseite abgekratzt.

6. Mikrophotometrie

a) Prinzip

Die Mikrophotometrie ist eine Methode, mit der die optischen Eigenschaften mikroskopischer Objekte, wie in unserem Falle das Reflexionsvermögen für Licht, gemessen werden. Der durch die β-Strahlung von ^{125}J über den Lymphozyten bzw. Erythrozyten körnig geschwärzte AR-10 Stripping-Film wird im Mikroskopphotometer MPV 2 (Leitz, BRD) mit Auflicht (21, 83) aus einer Quecksilberlampe St 75 beleuchtet. Die bei der Belich-

tung des Filmes über einem markierten Lymphozyten entstandene Zahl der Silberkörner ist bei nicht zu hoher Silberkorndichte der von den Körnern bei Auflichtbeleuchtung reflektierten Lichtmenge direkt proportional (21, 36, 83). Dieses Licht wird mit Hilfe einer Photokathode und eines Photomultipliers in einen Meßstrom umgewandelt. Auf diese Weise können photometrische Meßwerte als Äquivalent für die Anzahl der Silberkörner angenommen werden.
Dieses Prinzip ist zuerst von Gullberg (40) und Rogers (83) veröffentlicht worden. Weitere Entwicklungen dieser photometrischen Methodik, wie z. B. die Einführung eines Standardobjektivs zur Calibrierung des Meßstrahles, wurden dann von Dörmer (24, 25, 26) dargestellt, wodurch diese Technik geeignet wurde zur quantitativen Einzelzellautoradiographie.

b) Meßvorgang und Meßgeräte

Nach Fixierung des Objektträgers wurden die zu messenden Zellen unter Ölimmersion aufgesucht und bei 160-facher Vergrößerung eingestellt. Das Auflicht kam von einer Quecksilberlampe St 75, die von einem stabilisierten Netzteil gespeist wurde. Die Größe des Meßfeldes konnte durch eine Irisblende mit variablem Durchmesser, die sog. Meßblende, variiert werden. Es bestand dabei die Möglichkeit, die Weite der Meßblende und die Größe der Zelle gleichzeitig zu betrachten und so die Öffnung der Irisblende unter Sichtkontrolle der Größe des

Meßfeldes anzupassen. Von Thiel (96) wurde nachgewiesen, daß es dabei nicht ausreicht, einen konstanten Prozentsatz der Silberkörner, die sich auf eine markierte Zelle projizieren, zu messen, da man einen erheblichen Fehler in Kauf nehmen würde. Es war deshalb erforderlich, das Meßfeld so groß zu wählen, daß alle oder nahezu fast alle Silberkörner über einer Zelle erfaßt wurden. Andererseits sollte es nicht zu groß gewählt werden, um die Background-Messung gering zu halten und Nachbarzellmessungen auszuschließen. Für die Versuche wurde die Öffnung der Meßblende gerade so groß gewählt, daß sie diesen Anforderungen entsprach und in den einzelnen Versuchsreihen nicht mehr verändert werden mußte.
Das von der Auflichtbeleuchtung von den Silberkörnern reflektierte Licht wurde bei der automatisch ablaufenden Messung integrierend über das gesamte Meßfeld von einer Photokathode gemessen. Ein nachgeschalteter Photomultiplier verstärkte den entstandenen Strom. Die photometrische Messung wurde in Digitalwerte umgewandelt und angezeigt. Über ein zugeschaltetes Rechensystem (Diehl combitron S, BRD) wurden diese Daten gleichzeitig ausgedruckt. Der Rechner war dabei so programmiert, daß neben den Meßwerten auch die Zahl der Werte, deren Mittelwert und die Standardabweichung ausgedruckt wurden. Zusätzlich war zur weiteren Datenverarbeitung, z. B. zur Erstellung von Histogrammen, ein Streifenlocher (Kienzle D 224) anschließbar. Der gesamte Meß- und Registriervorgang konnte allein durch einen Hand- oder Fußschalter ausgelöst werden.

c) Eichung des Meßstrahles

Um die Meßwerte für die einzelnen markierten Zellen vergleichen zu können, wurde das Photometer mit einer Eichblende, die anstelle der Meßblende in den Lichtweg eingelegt wurde, auf einen photometrischen Standard geeicht. Zudem wurde ein Eich-Objektiv mit einem Reflektor (Reflektionsstandard) eingeschaltet (24, 26). Zur Eichung wurde die Spannung des Multipliers so variiert, daß der resultierende Meßwert des Systems Meßstrahl/Eichobjektiv/Eichblende einen konstanten, pro Versuch einheitlich festgelegten Wert ergab. Die Ermittlung eines geeigneten Meßbereiches wurde so vorgenommen, daß die am stärksten markierten Zellen eben noch meßbar waren. Dadurch konnten bei den weniger stark markierten Zellen auch noch feinere Unterschiede gemessen werden.
Um den Einfluß von Stromschwankungen im Meßsystem weitgehend auszuschalten, wurden diese Eichungen mindestens jede halbe Stunde kontrolliert.

d) Untergrundmessung

Auf jedem Präparat wurde auch über unmarkierten Zellen ein photometrischer Meßwert angezeigt. Diese sog. "Untergrundhelligkeit" oder auch "Background" wird durch Streulicht im optischen System des Photometers, durch Reflexion des Lichtes an optischen Grenzflächen des Autoradiogramms, durch Remission

von Farbstoffteilchen auf den gefärbten Zellen und durch Silberkörner, die über das Präparat verstreut entstanden sind, hervorgerufen (25). Für die Berechnung mußte dieser "Background-Wert" vom photometrischen Meßwert jeder Zelle jedoch abgezogen werden. Da der Anteil, den Farbstoffpartikel der gefärbten Zellen am Untergrundwert auch bei Verwendung eines Interferenzfilters (22) haben können, nicht unerheblich sein kann (96), war es ratsam, den Untergrundwert über unmarkierten Zellen, die auf jedem Autoradiogramm mit aufgebracht wurden, zu bestimmen.
In unseren Versuchen wurden sowohl für die Standardzellen als auch für die Lymphozyten jeweils 20 Untergrundmessungen an verschiedensten Stellen des Objektträgers vorgenommen und der errechnete Mittelwert in die Berechnung übernommen.

7. Markierungsindex

Nicht alle auf einem Autoradiogramm aufgebrachten Zellen waren bei Betrachtung im Mikroskop für das Auge markiert. Lediglich über einem bestimmten Prozentsatz der exponierten Zellen fanden sich Silberkörner. Um den für das jeweilige Autoradiogramm zutreffenden Markierungsindex zu bestimmen, wurden an verschiedenen Stellen des Präparates mindestens 500 Lymphozyten aufgesucht und in markiert und nicht-markiert

eingestuft. Der prozentuale Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzahl der aufgesuchten Zellen entsprach dabei dem jeweiligen Markierungsindex.
Eine andere Möglichkeit, den Markierungsindex festzustellen, besteht darin, mit dem Photometer MPV 2 die photometrischen Meßwerte von etwa 500 aufeinanderfolgenden Zellen zu messen und in einem Histogramm (siehe III. 7.) darzustellen. Da sich die unmarkierten Zellen dabei deutlich von den markierten in ihrem photometrischen Meßwert unterscheiden, kann ihre Zahl ebenfalls in Relation zur Gesamtzahl der gemessenen Zellen gebracht werden, was einem objektiven Markierungsindex entspricht (95). Es zeigte sich jedoch bei den hier durchgeführten Versuchen, daß der Fehler relativ gering war, wenn der Markierungsindex lediglich visuell bestimmt wurde. Bei einem diesbezüglich durchgeführten Vergleich wurde ein Markierungsindex von 10,3 % durch visuelle Auswertung bestimmt, während das optische Gerät 12,0 % der Zellen als markiert erkennen konnte. Auf sämtlichen angefertigten Autoradiogrammen wurde deshalb der Markierungsindex im allgemeinen visuell bestimmt.

8. Histogramm

Um die Verteilung der unterschiedlich stark markierten Lym-

phozyten in einer Zellpopulation zu erfassen, wurden stets von etwa 400 markierten Zellen die photometrischen Meßwerte bestimmt. Ein dem Mikroskopphotometer zugeschalteter Streifenlocher (Kienzle D 224) wandelte dabei die photometrischen Vergleichswerte in Digitalwerte um, die einem Interdata Computer M 70 eingegeben wurden. Dieser lieferte gemäß eines entsprechenden Programmes ein graphisches Schaubild, in dem die Zellen nach ihrem photometrischen Meßwert in verschiedenen Klassen eingeteilt und dort in ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der Zellen angegeben wurden. Auf jedem Autoradiogramm wurden zusätzlich noch mindestens 100 unmarkierte Lymphozyten gemessen und in das Histogramm übertragen, um die Population der unmarkierten Lymphozyten der der markierten gegenüberzustellen (siehe Abb. 3, 4, 5).

9. Quantifizierung von Immunglobulinmolekülen auf einzelnen Lymphozyten

Die Bestimmung der Anzahl von Immunglobulinen, die sich als Antikörper auf einzelne Lymphozyten gebunden haben, erfolgte wie von Thiel et al. (96) beschrieben. Hiernach muß man, um die Zahl der Immunglobulinmoleküle auf einem Lymphozyten berechnen zu können, die spezifische Aktivität der einzelnen Standardzelle, die spezifische Aktivität eines einzelnen Antikörpermoleküls

und die photometrischen Meßwerte eines Lymphozyten und einer Standardzelle kennen.

Die spezifische Aktivität einer Standardzelle, im folgenden mit "S" bezeichnet, ergibt sich aus dem Quotienten von Radioaktivität der Standardzellen in 20 µl, die im Gamma-Counter gemessen wurde und in "counts per minute" ausgedrückt wird und der Zahl der Standardzellen, die in diesen 20 µl enthalten sind. Diese wurde durch die Auszählung in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

$$S = \frac{\text{cpm-gesamt}}{\text{Anzahl der Zellen}} = \frac{\text{cpm}}{\text{Zelle}}.$$

Die spezifische Aktivität eines Antikörpermoleküls, im folgenden mit "A" bezeichnet, ergibt sich aus folgender Formel:

$$A = \frac{\text{Proteinstandard x Molekulargewicht}}{\text{Proteinkonzentration x Molekülzahl}}$$

$$A = \frac{\text{cpm}}{\text{Molekül}}$$

Der Proteinstandard, der die Radioaktivität von 2 µl markiertem Antiserum angibt, wurde ebenfalls im Gamma-Counter gemessen. Die Immunglobulinkonzentration wurde, wie unter III. 2. beschrieben, im Zeiss-Photometer bei 280 nm bestimmt.

Für das IgG-Molekül wurden als Molekulargewicht 160 000 g im Rechenansatz verwendet. Für 1 Mol des jeweiligen Antikörpers wurden nach Loschmidt 6×10^{23} Moleküle eingesetzt.

Die Zahl der Antikörpermoleküle, die an die Membran eines

einzelnen Lymphozyten gebunden wurden, ergab sich aus folgender Formel:

$$M = \frac{\text{Meßwert Lymphozyt}}{\text{Meßwert Standardzelle}} \times \frac{S}{A}$$

10. Statistische Auswertung

Die bei der Auswertung eines Autoradiogramms erhaltenen photometrischen Meßwerte wurden in das vorprogrammierte Rechensystem Diehl combitron S (BRD) eingespeist. Waren genügend Zellen gemessen, so konnte der Rechenmaschine das Programm abgerufen werden, das den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung (SD) davon ermittelte. Der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) wurde nach der Formel $\frac{SD}{\sqrt{n}}$ (n ist die Zahl der Messungen) ausgerechnet.
Für den statistischen Vergleich der Ergebnisse von unterschiedlichen und gleichen Spendern an verschiedenen Tagen wurden der Students- und Wilcoxon-Test für zwei Stichproben herangezogen. Der Wertevergleich wurde mit dem Interdata Computer M 70 durchgeführt (Dipl. Phys. W. Ruppelt, EDV-Abteilung im Institut für Hämatologie, München).

IV. ERGEBNISSE

1. Ermittlung der Sättigungskonzentration von Antikörpern

Da es sich bei den vorliegenden Experimenten um die Darstellung und Messung einer Antigen-Antikörper-Reaktion an der Zellmembran handelte, wobei die Menge der als Antigene angenommenen Oberflächenrezeptoren eines B-Lymphozyten unbekannt war, mußte gewährleistet sein, daß eine ausreichende Anzahl von Antikörpermolekülen zur Verfügung stand, die die vorhandenen Bindungsstellen vollständig absättigen konnten. Um diesen Sättigungsbereich zu ermitteln, wurden mehrere Versuchsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen markierten Antikörperpräparation durchgeführt. Auf jedem Präparat wurden Standardzellen mitexponiert. Aus den photometrischen Meßdaten der markierten Lymphozyten wurde mit Hilfe der Standardzellmeßwerte der Mittelwert der an die Zelle gebundenen Anzahl von Antikörpermolekülen errechnet und beim dazugehörigen Konzentrationswert mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes graphisch dargestellt. Abb. 1 zeigt dazu zwei verschiedenen Experimente, die mit peripheren Lymphozyten von zwei Normalpersonen durchgeführt wurden, wobei derselbe markierte Antikörper, nämlich IgG-anti IgG, jedoch mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität, verwendet worden war.

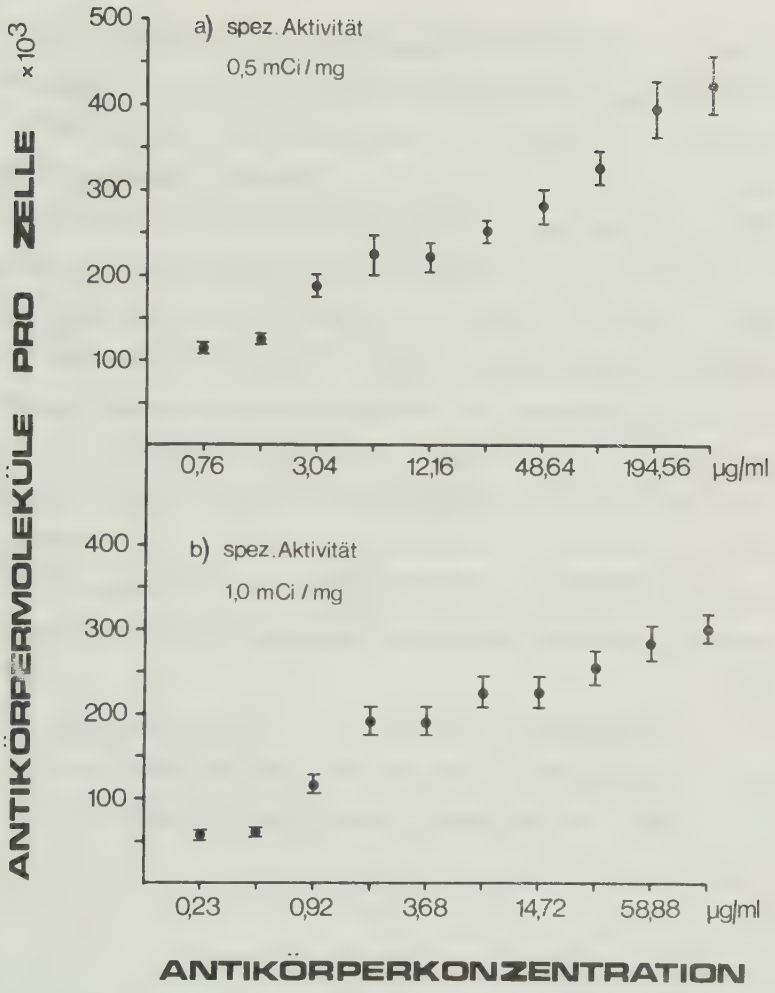

Abb. 1: Abhängigkeit der Anzahl der Moleküle pro Einzelzelle von der Konzentration des markierten Antikörpers. Bei den Experimenten in a) und b) wurden unterschiedlich stark markierte Antikörper verwendet.

In Abb. 1a ist die Titrierungskurve des Antikörpers mit einer niedrigeren spezifischen Aktivität von 0,5 mCi/mg dargestellt, in Abb. 1b die Kurve bei doppelter spezifischer Aktivität von 1,0 mCi/mg. Aus beiden Kurvenverläufen ist ersichtlich, daß die Zahl der Moleküle, die an eine Zelle gebunden wird, mit steigender Konzentration des Antikörpers zunimmt, bis sie in etwa ein Plateau erreicht, um nach diesem dann erneut auszusteigen. Dieses Plateau zeigt an, daß alle antigenen Bindungsstellen durch Antikörpermoleküle besetzt sind. Abb. 1 zeigt außerdem, daß trotz unterschiedlicher spezifischer Aktivität im selben Antikörperkonzentrationsbereich, nämlich im ersten Fall zwischen 6,08 und 48,6 µg/ml und im zweiten zwischen 1,86 und 29,6 µg/ml, die Sättigung der antigenen Bindungsstellen der peripheren Lymphozyten erreicht wurde.
Um für die folgenden Versuche sicher im Sättigungsbereich zu liegen, wurden jeweils Antikörperkonzentrationen zwischen 16 und 30 µg/ml (im Durchschnitt um 23 µg/ml) verwendet.

2. Verschiedene Expositionszeiten

Da neben der spezifischen Aktivität des Antikörpers auch die Expositionszeit (siehe auch III. 5.) des Filmes von Einfluß auf die Silberkornentstehung und damit auf den photometrischen Meßwert der markierten Zellen war, mußte eine für alle

Versuche gültige Expositionszeit gewählt werden. Eine zu kurze Expositionszeit beinhaltete die Gefahr, daß zu wenig Silberkörner im AR-10 Stripping-Film entstanden. Da die Beziehung zwischen der Anzahl von β-Partikeln und der resultierenden Filmschwärzung linear ist (12, 7), war bei längeren Expositionszeiten von einer vermehrten Silberkornbildung auszugehen, die jedoch bei zu langer Expositionszeit durch zu starke, nicht mehr genau meßbare Schwärzung limitiert ist.

Tab. 2: Ergebnisse bei verschiedenen Expositionszeiten

Spender	Antikörper	Expositionszeit (Tage)	Ig-Determinanten/Zelle x 10^3
1. Th (1)	IgG-anti IgG	2	232 ± 111
2. Th (2)	IgG-anti IgG	5	230 ± 99
3. Sz (1)	$F(ab')_2$-anti IgM	5	92 ± 23
4. Sz (2)	$F(ab')_2$-anti IgM	6	106 ± 28

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse von Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Expositionszeiten zusammengestellt. So wurden im ersten Versuch ein Teil der Präparate von einer Normalperson, deren periphere Lymphozyten mit dem Antikörper IgG-anti IgG inkubiert worden waren, für 2 Tage und für 5 Tage exponiert. Bei Umrechnung ergab sich für

den Spender eine Immunglobulindeterminantendichte von 232 000 nach 2 Tagen, eine von 230 000 pro Zelle nach 5 Tagen.
Im zweiten Versuch wurden die Lymphozyten eines anderen Spenders mit dem Antikörper $F(ab')_2$-anti IgM inkubiert. Nach 5 Tagen Expositionszeit fanden sich 92 000, nach 6 Tagen 106000 Immunglobulindeterminanten pro Zelle.
Wir wählten für sämtliche Versuchsansätze eine mittlere Expositionszeit von 5 Tagen, da unter unseren experimentellen Bedingungen (1-3 µCi/µg Immunglobulin; siehe III. 2.) die Zellen hierbei ausreichend stark markiert wurden und der Background (siehe III. 6.d) niedrig gehalten werden konnte.

3. Blocking-Experiment

Um die Spezifität des Anti-Human-Immunglobulin-Serums zu prüfen, wurde ein Blocking-Experiment durchgeführt. Dabei wurde im ersten Teil des Versuches die Lymphozytensuspension einer Normalperson wie üblich mit radiojodiniertem IgG-anti IgG Antikörpern in verschiedener Konzentration inkubiert. In diesem Fall wurden die Rezeptoren an der Lymphozytenmembran mit Antikörpern besetzt und radioaktiv markiert. Für alle 4 Versuchsansätze wurden photometrische Meßwerte ermittelt und in Absolutwerte umgerechnet (Tab. 3).

Tab. 3: Blocking-Experiment:
Lymphozyten inkubiert mit dem Antikörper IgG-anti IgG mit oder ohne Vorinkubation mit IgG

	ohne Vorinkubation		mit Vorinkubation
AK-Konzentration	% markierte Zellen	Ig-Determinanten pro Zelle x 10^3	% markierte Zellen
66 µg/ml	28	583 ± 341	0
33	20	314 ± 187	0
16,5	17	297 ± 110	0
8,3	1	165 ± 32	0

Bei einer hohen Antikörperkonzentration wurden entsprechend mehr Antikörpermoleküle an die Zelloberfläche gebunden als bei einer geringeren Konzentration. Entsprechend verhielten sich auch die Markierungsintensitäten. Für den Bereich der Sättigung, die bei einer Antikörperkonzentration von 16,5 µg/ml erreicht war, wurden durchschnittlich 297 000 Antikörpermoleküle an die Immunglobulindeterminanten eines Lymphozyten gebunden. 17 % der Zellen in der Suspension wurden dabei markiert.

Im zweiten Teil des Versuches wurden der Zellsuspension in simultanen Versuchsansätzen zum anti Ig-Antiserum noch als Antigene IgG-Moleküle in einer Konzentration von 10 mg/ml

zugegeben. Da der Antikörper spezifisch für diese Antigene war, wurden sie bereits in der Lösung gebunden. Nachdem der Antikörper bei dieser Reaktion verbraucht wurde, konnte er nicht mehr die Rezeptorstellen der Lymphozytenmembran besetzen. Deshalb konnte auch auf allen vier hergestellten Autoradiogrammen keine markierte Zelle gefunden und damit auch kein photometrischer Meßwert erhalten werden, der einer markierten Zelle entsprochen hätte.

c. Bestimmung der Bindung direkter und indirekter Antikörper

Bei der Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die als Antigene angenommenen Oberflächenimmunglobuline wurden diese Bindungsstellen im Sättigungsbereich vollständig abgesättigt. Die Anzahl der dabei gebundenen direkt reagierenden Antikörper kann, wie beschrieben, ermittelt werden. Bei sog. indirekt markierenden Versuchsansätzen wird so vorgegangen, daß die Antigene der Zelle zuerst mit einem unmarkierten direkten Antikörper abgedeckt werden, um dann, in einem zweiten Schritt, diese Antikörper mit gegen diese gerichteten, indirekten Antikörpern zu markieren. Hierbei ist jedoch das Reaktionsverhältnis direkter zu indirekter Antikörper unbekannt. Um hierüber Aufschluß zu bekommen, wurde der folgende Versuch unternommen.

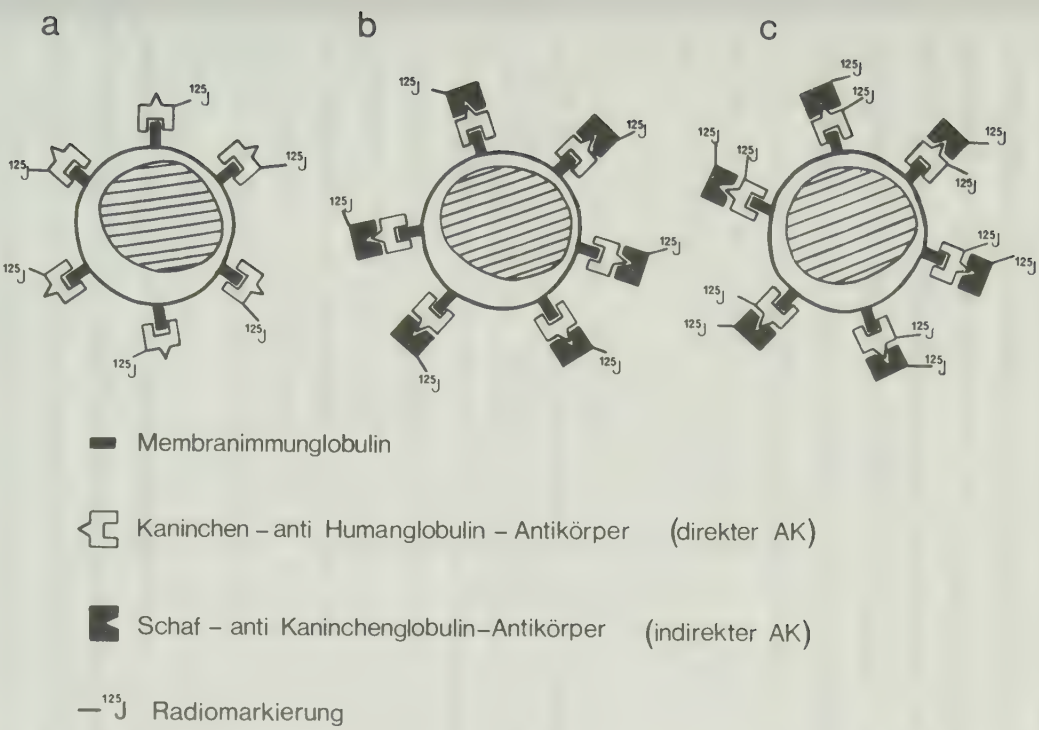

Abb. 2: Versuchsschema zum Sandwich-Serum-Versuch

Wie im Versuchsschema in Abb. 2a dargestellt, wurden im ersten Teil des Versuches die Membranimmunglobuline menschlicher Lymphozyten mit einem ^{125}Jod-markierten Kaninchen-anti Humanglobulin-Antikörper (=direkter Antikörper) in Reaktion gebracht. Die von diesem Versuch angefertigten Autoradiogramme wurden in beschriebener Weise ausgewertet. Im Sättigungsbereich des Antikörpers wurden durchschnittlich 209 000 anti Ig-Moleküle (Tab. 4) pro Zelle gebunden.

Tab. 4:

Konzentration Sandwich-AK (mg/ml)	Anzahl der Sandwich AK-Moleküle/Zelle x 10^3	anti Ig	Verhältnis anti Ig/Sandwich-AK pro Zelle
0,17	255	209	1 : 1,20
0,085	196	209	1 : 0,94
0,021	167	209	1 : 0,80
0,0053	-	209	-

Im zweiten Teil des Versuches (Abb. 2b) wurden die Membranimmunglobuline zuerst wiederum mit anti Ig (=direkter AK) abgesättigt. Der direkte Antikörper war dabei nicht markiert. Er wurde in diesem Fall jedoch zusätzlich mit einem ^{125}J-markierten Schaft-anti Kaninchen-Antikörper (=indirekter oder Sandwich-Antikörper) in Reaktion gebracht. Der Sandwich-AK

wurde dabei in absteigender Konzentration von 0,17 bis 0,0053 mg/ml verwendet. Die dabei auf den Lymphozyten pro Zelloberfläche durchschnittlich gebundenen Sandwich-AK-Moleküle sind wiederum in Tab. 4 aufgeführt. Eine Konzentration des Sandwich-Antikörpers von 0,0053 mg/ml reichte unter den gewählten Bedingungen bezüglich Jodsubstitution und Expositionszeit nicht mehr, eine nachweisbare Markierung des direkten Antikörpers zu erreichen. Bildet man nun das Verhältnis aus der Zahl der durchschnittlich pro Zelle gebundenen anti Ig- und Sandwich-AK-Moleküle, so zeigt sich, daß beide Antikörper etwa im Verhältnis 1 : 1 reagierten (Tab. 4).

Im dritten Teil des Versuches (Abb. 2c) waren sowohl der direkte als auch der indirekte Antikörper mit ^{125}Jod markiert. Wenn beide Antikörper im Sättigungsbereich gleichzeitig reagieren konnten, mußte theoretisch eine Markierungsintensität zu erwarten sein, die der Summe der Einzelmarkierungsintensitäten bei der isolierten Inkubation mit dem direkten bzw. mit dem indirekten Antikörper entsprach. Bei der Berechnung der Ergebnisse mußte auf eine Umrechnung in Absolutwerte verzichtet werden, da beide Antiseren verschiedene spezifische Aktivitäten besaßen, die nicht in einen gemeinsamen Rechensatz einbezogen werden können, und da außerdem bekannt war, welcher der beiden radioaktiven Reaktionspartner für die Silberkornbildung verantwortlich war. Um trotzdem einen zahlenmäßigen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde als Maß der erzielten Markierungsintensitäten der Quotient aus dem Meßwert eines markierten Lymphozyten (MWZ) und einer markierten Standardzelle (MWSTZ) herangezogen.

Tab. 5:

Konzentration Sandwich-Serum (mg/ml)	anti Ig-AK	Sandwich-AK	beide AK (tatsächlicher Meßwert)	beide AK (theoretischer Wert)
0,17	0,36+	0,26+	0,59+	0,62

+ Quotient aus MWZ und MWSTZ (siehe Text)

Tab. 5 zeigt, daß in der Tat bei einer Konzentration des Sandwich-Serums von 0,17 mg/ml der theoretisch erwartete Summationswert nahezu vorlag. Addiert man nämlich die beiden Quotienten der photometrischen Meßwerte von Lymphozyt und Standardzelle - [0,36] bei alleiniger direkter Markierung unter Verwendung von anti Ig und [0,26] bei indirekter Markierung unter Verwendung des Sandwich-Serums - so erhält man mit [0,62] einen theoretischen Wert, der nur geringfügig über dem experimentell erhaltenen von [0,59] liegt, der mit der doppelten Markierung mit den radiojodinierten direkten und indirekten Antikörpern erhalten worden war.
Somit konnte nachgewiesen werden, daß in einem bestimmten Bereich die Gesamtmarkierungsintensität der Summe der Einzelmarkierungsintensitäten entspricht.

5. Quantifizierung der Immunglobulindeterminanten von Lymphozyten unter Verwendung eines radiojodinierten anti IgG-Antikörpers

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen

Der Antikörper in dieser Versuchsreihe war ein aus Kaninchen durch Immunisierung mit humanem IgG gewonnenes Antiserum (siehe II. 3.). Wie schon erwähnt, reagierte dieser Antikörper nicht nur mit IgG, sondern über die Reaktivität mit Leicht-Kettendeterminanten auch mit anderen Immunglobulinen, wie etwa IgM und IgD. Er verhielt sich somit wie ein polyvalentes anti-Ig Reagens. Mit ihm wurden periphere Lymphozyten von insgesamt 15 Normalpersonen und das Knochenmark einer Normalperson untersucht (siehe Tab. 6). Die Markierungsindices der Lymphozyten von 15 Blutspendern schwankte dabei von 7 bis 25 %, der Durchschnittswert betrug 15 % markierte Zellen. Für die Mittelwerte der Ig-Determinanten der einzelnen Spender errechneten sich Werte von 223 000 bis 326 000. Der Durchschnittswert betrug hier 266 000 Ig-Determinanten pro Zelle. Eine Korrelation zwischen der Zahl der markierten Zellen und der Markierungsstärke war nicht erkennbar.
In einem Fall wurde mit demselben Antikörper eine Knochenmarksprobe untersucht. Es ergaben sich 3 % markierte Zellen. Die Zahl der Antikörpermoleküle, die pro Zelloberfläche der Knochenmarkslymphozyten gebunden wurde, lag mit 198 000 nicht wesentlich niedriger als die auf B-Zellen des peripheren Blutes.

Tab. 6: Prozentsätze markierter Lymphozyten und immunautoradiographisch gemessene Anzahl gebundener Antikörper pro Zelle nach Inkubation der Blutlymphozyten verschiedener Spender mit einem radiojodinierten anti IgG-Antikörper

Spender	% markierte Zellen	Ig-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Re	9	267 ± 136
2. Pü	7	326 ± 144
3. Be	13	223 ± 112
4. Th	16	270 ± 103
5. Ap	13	246 ± 202
6. Tr	22	248 ± 141
7. We	25	271 ± 112
8. Ne	14	246 ± 136
9. Ba	8	309 ± 180
10. Kl	12	288 ± 148
11. Zi	13	240 ± 157
12. Ki	13	235 ± 159
13. Le	22	259 ± 170
14. La	25	267 ± 152
15. Da	17	197 ± 110
16. Knochenmark	3	198 ± 62
Durchschnitt 1. - 15.	15 ± 6	266 ± 29 $x10^3$

b) Markierung von Lymphozyten desselben Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten

Um eventuelle zeitliche Schwankungen der Anzahl markierter Lymphozyten wie auch der Ig-Determinantendichte pro Zelle zu erkennen, wurden bei 3 Normalpersonen an verschiedenen Tagen Blutproben abgenommen und Autoradiogramme angefertigt. Hierbei wurde in allen Versuchsansätzen das polyvalent reagierende anti IgG-Antiserum zur Inkubation der Lymphozyten verwendet. Die Meßwerte der photometrisch ausgewerteten Autoradiogramme sind in Tab. 7 wiedergegeben.
Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß die Anzahl der markierten Lymphozyten nur unerheblich schwankte, wenn sie bei einer identischen Normalperson zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurde. Die pro Einzelzelle gebundene Anzahl von Antikörpern schwankte bei jedem Spender von Zelle zu Zelle jedoch recht erheblich, wie aus der beträchtlichen Standardabweichung zu entnehmen ist. Beim Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Ig-Determinanten pro Zelle bei verschiedenen Spendern ergaben sich nur relativ geringe Unterschiede, wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist.
Eine statistische Untersuchung der Ergebnisse wurde auf dem Interdata Computer M 70 mit dem Wilcoxon-Test für die Absolutwerte der Ig-Determinanten durchgeführt, wobei die Meßwerte der einzelnen Lymphozyten in verschiedenen Kollektiven verglichen wurden. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Ig-Determinanten auf Lymphozyten ein und desselben Spenders, wenn Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden ($p<0,001$). Dasselbe galt für

den statistischen Vergleich der Anzahl der markierten Zellen bei einem Spender.

Tab. 7: Inkubation der Blutlymphozyten verschiedener Spender mit einem radiojodinierten anti IgG-Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten

Spender	Datum	% markierte Zellen	Ig-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Re (1)	3. 9.74	9	267 ± 136
2. Re (2)	10.10.74	8	281 ± 148
3. Le (1)	14. 2.75	22	259 ± 170
4. Le (2)	21. 2.75	16	228 ± 149
5. Th (1)	14.10.74	10	300 ± 260
6. Th (2)	21. 1.75	16	270 ± 103
7. Th (3)	6. 3.75	16	284 ± 229
8. Th (4)	7. 3.75	15	230 ± 99
9. Th (5)	11. 4.75	13	286 ± 125
Gefrorene Zellen:			
10. Th (6)	10. 3.75	17	255 ± 119

c) Versuch mit gefrorenen Zellen

In einem weiteren Experiment wurde die Lymphozyten-Suspension einer Normalperson (Th) in DMSO bei -180° eingefroren. Der Zellstoffwechsel ist durch diese Behandlung zum Erliegen gebracht worden. Nachdem die Zellen nach 3 Tagen wieder auf-

getaut worden waren, wurden sie in der üblichen Weise mit Antikörpern inkubiert und autoradiographiert. Die Ergebnisse (Tab. 7) zeigen, daß der Markierungsindex von 17 % etwa dem in den anderen 5 Versuchen entsprach. Auch die Zahl der gebundenen Antikörpermoleküle nach dem Auftauen lag mit 255 000 pro Zelle ebenfalls innerhalb der Schwankungsbreite bei nicht gefrorenen Zellen.
Entsprechend diesem allerdings nur in einem Fall durchgeführten Experiment könnten Lymphozytensuspensionen über längere Zeit im tiefgefrorenen Zustand gelagert werden, ohne daß die Bestimmung der Anzahl der Ig-tragenden Lymphozyten oder die Menge der Ig-Determinanten pro Zelle verfälscht würde.

6. Quantifizierung der IgM-Determinanten einzelner Lymphozyten unter Verwendung eines anti IgM-Globulins

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen

Durch passive Hämagglutination war nachgewiesen worden, daß das für die Versuche verwendete Antiserum monospezifisch für die schwerden Ketten des IgM-Moleküls war. Wie in Tab. 8 dargestellt, wurde mit diesem anti IgM-Antikörper bei 8 Normalpersonen eine Durchschnittsmarkierung von 22 % der Lymphozyten erreicht, wobei die prozentualen Werte für die einzelnen Spender zwischen 16 und 28 % schwankten. Die Anzahl der gebun-

denen AK-Moleküle lag im Durchschnitt bei 187 000, die Resultate differierten dabei zwischen 150 000 und 210 000. Die Anzahl der markierten Lymphozyten wie auch die Dichte der IgM-Determinanten pro Zelle zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Spender. Bei der Beurteilung dieser Resultate ist jedoch zu bedenken, daß das Jod-markierte Reagens auch über seinen Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der Zellmembran gebunden werden kann (Kunkel, 1975).

Tab. 8: Anzahl markierter Lymphozyten und Menge gebundener Antikörpermoleküle bei Normalpersonen (a) und einer T-Zell-Linie (b) als Kontrolle unter Verwendung eines anti IgM-Globulins

	Spender	% markierte Zellen	IgM-Determinanten/Zelle $x10^3$
a)	1. Ho	28	205 ± 83
	2. Sc	25	194 ± 70
	3. Tr	29	173 ± 55
	4. Re	16	210 ± 60
	5. Ja	28	199 ± 56
	6. Ka	16	150 ± 66
	7. Ju	18	185 ± 43
	8. Ra	19	180 ± 48
	Durchschnitt	22 ± 6	187 ± 15
b)	1. Jurkat (1)	0	
	2. Jurkat (2)	0	

b) T-Zell-Linie

Bei zwei Experimenten wurde eine Suspension der T-Zell-Linie Jurkat in der selben Weise mit markierten anti IgM-Antikörpern inkubiert und autoradiographiert. Es konnte hierbei in keinem Fall eine Markierung der Zellen dieser T-Zell-Linie nachgewiesen werden (Tab. 8), sodaß diese Zellen eine negative Kontrolle für Experimente mit anti IgM darstellen können, welches definitionsgemäß nur mit immunglobulinpositiven B-Lymphozyten reagieren sollte.

7. Bestimmung der Bindung eines gegen IgM gerichteten Antikörperfragmentes an einzelnen Lymphozyten

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen

Um eine mögliche Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren ausschließen zu können, wurden Versuche unter Verwendung eines Antiserums durchgeführt, das nur noch den durch Pepsinierung des IgG-Moleküls entstandenen $F(ab')_2$-Teil enthielt. 8 der 10 Spender, deren B-Lymphozyten mit diesem markierten Antikörperfragment inkubiert wurden (Tab. 9), waren simultan, wie im vorherigen Kapitel geschildert, mit dem kompletten Antikörper IgG-anti IgM getestet worden, sodaß ein direkter Vergleich zwischen der Bindung der beiden Antiseren möglich ist.

Die durchschnittliche Markierungsintensität lag mit 16 % deutlich unter der bei Verwendung des kompletten Antikörpers (siehe Tab. 8). Die Markierung schwankte zwischen 10 und 22 %. Ebenfalls unterschiedlich, verglichen mit den Werten aus Tab. 8 war die durchschnittliche Ig-Determinantenzahl von 126 000 pro Zelle bei einer Schwankungsbreite der Mittelwerte verschiedener Spender von 91 000 bis 162 000.

Tab. 9: Anzahl markierter Lymphozyten und Menge gebundener Antikörpermoleküle bei Normalpersonen (a) und T-Zell-Linien (b) als Kontrolle unter Verwendung eines gegen IgM gerichteten Antikörperfragmentes

	Spender	% markierte Zellen	IgM-Determinanten/Zelle $x10^3$
a)	1. Ho	22	162 ± 80
	2. Sc	18	129 ± 79
	3. Tr	14	113 ± 60
	4. Re	14	135 ± 85
	5. Ja	17	110 ± 44
	6. Ka	10	140 ± 47
	7. Ju	19	154 ± 54
	8. Ra	10	116 ± 29
	9. De	18	91 ± 27
	10. Sz	16	106 ± 28
	Durchschnitt	16 ± 4	126 ± 22
b)	1. Jurkat +	0	
	2. Molt ++	0	

\+ Jurkat wurde in 4 Experimenten getestet
++ Molt wurde in 2 Experimenten getestet

b) T-Zell-Linien

Als negative Kontrollen wurden wiederum die T-Zell-Linien Jurkat und T-Molt bei den Experimenten mitgeführt. Dabei wurde die T-Zell-Linie Jurkat 4 mal, die T-Zell-Linie Molt 2 mal mit Antikörpern inkubiert und autoradiographiert. Bei völlig gleicher Behandlung konnte jedoch nie eine Markierung nachgewiesen werden.

c) Bestimmung der Bindung des Antikörperfragmentes $F(ab')_2$-anti IgM an Lymphozyten mehrerer Spender bei Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten

Bei verschiedenen Spendern wurden zu wiederholten Malen zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen und die separierten Lymphozyten auf die Anzahl der IgM-tragenden Lymphozyten wie auch die Dichte der IgM-Determinanten pro Zelle untersucht. Hierbei wurde das radiojodinierte Antikörperfragment $F(ab')_2$-anti IgM zur Inkubation der Lymphozyten verwendet. Die Meßwerte der photometrisch ausgewerteten Autoradiogramme sind in Tab. 10 wiedergegeben. Ähnlich wie bei der mit anti-Ig (siehe Tab. 7) durchgeführten Untersuchung zeigte sich, daß die Anzahl der markierten Lymphozyten nur unerheblich schwankte, wenn sie bei der identischen Normalperson zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurde. Ebenfalls gering nur schwankte die berechnete Anzahl der IgM-Determinanten pro Zelle bei den verschiedenen Spendern.

Tab. 10: Bestimmung der IgM-Determinantendichte und der Anzahl IgM-tragender Lymphozyten im Blut verschiedener Normalpersonen bei Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter Verwendung eines radiojodinierten $F(ab')_2$-anti IgM

Spender	Datum	% markierte Zellen	IgM-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Re (1)	16.2.76	14	135 ± 85
2. Re (2)	30.3.76	10	116 ± 29
3. Re (3)	31.5.76	14	86 ± 21
4. Ja (1)	16.2.76	17	110 ± 44
5. Ja (2)	15.6.76	13	100 ± 37
6. Sc (1)	16.2.76	18	129 ± 79
7. Sc (2)	28.7.76	18	124 ± 35
8. De (1)	21.6.76	18	91 ± 27
9. De (2)	28.7.76	19	94 ± 29

Um eine statistische Analyse auf mögliche signifikante Unterschiede zwischen den Meßkollektiven durchzuführen, wurde jeder einzelne Meßwert pro Zelle einer Versuchsperson in den Absolutwert umgerechnet. Diese Werte aller Testpersonen wurden über Lochstreifen in den Interdata Computer M 70 eingespeist und mit dem Wilcoxon- und t-Test für ungepaarte Werte statistisch verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Absolutwerte einer Normalperson an verschiedenen Tagen unterscheiden, sehr gering ist ($p<0,005$ bis $p<0,001$). Das

selbe galt für den statistischen Vergleich der Meßdaten von verschiedenen Spendern. Auch hier war die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß die Meßwerte unterschiedlichen Kollektiven angehören ($p<0,005$ bis $p<0,001$). Ebenso konnte für die Anzahl der markierten Zellen bei einer Testperson kein oder nur ein geringer Unterschied festgestellt werden, wenn die Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte.

d) Histogramm der IgM-Determinantendichte pro Lymphozyt im Blut eines Spenders (Ju)

Um die Verteilung der IgM-Determinantendichte pro Zelle innerhalb der Zellpopulation eines Spenders zu untersuchen, wurde eine histographische Auftragung aller Meßwerte nach ihrer Häufigkeit für eine bestimmte Dichte aufgetragen. Die Lymphozyten waren mit dem radiojodinierten Antikörperfragment $F(ab')_2$-anti IgM inkubiert worden. Auf einem Autoradiogramm wurden 100 nicht markierte und 400 markierte Zellen gemessen und die Werte über einen Lochstreifen in den Interdata Computer M 70 eingespeist. Dieser trug die prozentuale Häufigkeit der Zellen in den einzelnen photometrischen Meßbereichen fortlaufend auf. Entsprechend der Proportionalität von photometrischem Meßwert und Zahl der gebundenen Antikörpermoleküle auf einem Lymphozyten veranschaulicht das Histogramm zugleich die Verteilung der Anzahl der Immunglobulindeterminanten auf den Lymphozytenmembranen.

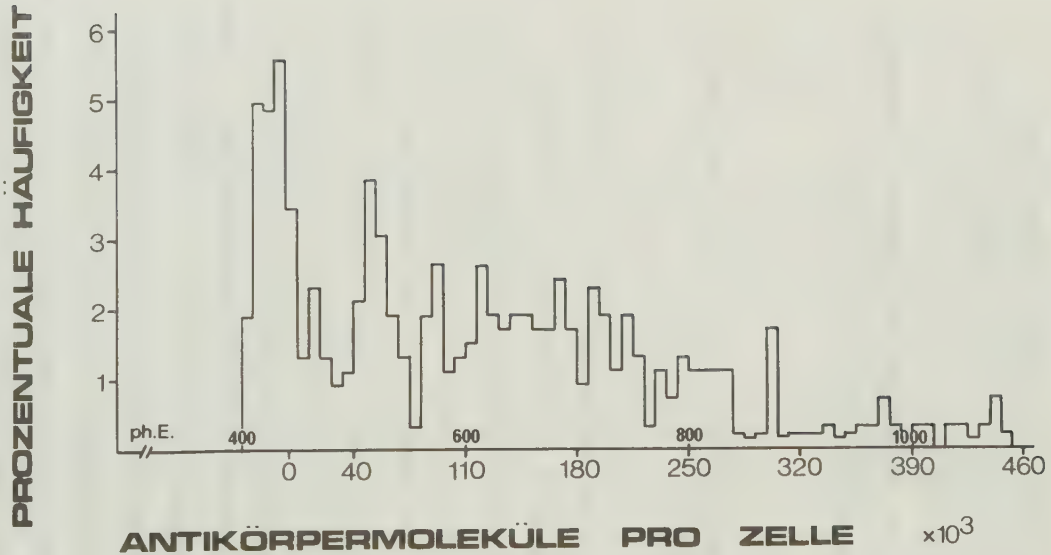

Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der photometrischen Meßwerte (ph.E.) und der IgM-Determinantendichten markierter Lymphozyten im Blut einer Normalperson (Ju). Von 0 bis zum ersten photometrischen Meßwert repräsentiert sich die Untergrundhelligkeit dieses Autoradiogramms. Im Bereich der linken Spitze finden sich im Histogramm die Meßwerte unmarkierter Zellen.

Von 0 bis zum ersten Meßwert ist die Untergrundhelligkeit dieses Autoradiogramms repräsentiert. Die Spitze der unmarkierten Zellen hebt sich deutlich ab. Ihre Verteilung im Bereich zwischen 410 und 480 photometrischen Einheiten läßt eine Gauß'sche Verteilung erkennen.
Die Verteilung der markierten Zellen reicht vom photometrischen Wert 490 bis zum Wert 1090. Dies entspricht im betreffenden Experiment $32x10^3$ bis $455x10^3$ Antikörpermoleküle pro Zelle. Demzufolge ist bei B-Lymphozyten des Blutes eine weite Streuung der Immunglobulindichte anzunehmen. Die Verteilung der Determinantendichte der markierten Zelle ist deutlich unterschiedlich zu einer Gauß'schen Normalverteilung, sodaß davon auszugehen ist, daß nicht nur eine Population von Zellen vorliegt, sondern mehrere. Auffallend ist, daß es Meßbereiche gibt, in denen sich gehäuft ähnlich stark markierte Zellen finden, die sich innerhalb der großen Streuung herausheben, wie z. B. zwischen den Werten 500 bis 550 und 560 bis 840.

8. Quantifizierung von Leicht-Kettendeterminanten mit Hilfe eines markierten Anti-kappa Fragmentes

a) Markierung der Lymphozyten von Normalpersonen

Wie Versuche mit immunglobulinbeladenen Erythrozyten in der passiven Hämagglutination zeigten, war der Antikörper $F(ab')_2$-anti k spezifisch für die Kappa-Ketten sämtlicher Oberflächenimmunglobuline. Durch die Pepsindegradierung zum $F(ab')_2$-Fragment wurde wiederum eine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren

verhindert.

Bei 5 untersuchten Normalpersonen (Tab. 11) wurden mit diesem Antiserum zwischen 101 000 und 138 000 Ig-Determinanten als Mittelwerte von je 50 Messungen gefunden. Der Durchschnitt lag bei 119 000. Zwischen 10 und 19 % der ausgestrichenen Zellen waren markiert, im Mittel 14 %.

Tab. 11: Antikörper $F(ab')_2$-anti k

Spender	% markierte Zellen	Ig-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Ja	14	115 ± 27
2. De	11	101 ± 27
3. Bl	16	121 ± 53
4. Th	19	138 ± 40
5. En	10	119 ± 57
Durchschnitt	14 ± 3	119 ± 13

b) Histogramm der Markierungsdichte von Lymphozyten einer Normalperson (Ja) nach Inkubation mit $F(ab')_2$-anti k

Abb. 4 zeigt das Histogramm von unmarkierten und mit dem Antikörper $F(ab')_2$-anti k markierten Lymphozyten einer Normalperson. 100 unmarkierte und 400 markierte Zellen wurden auf demselben Autoradiogramm gemessen.

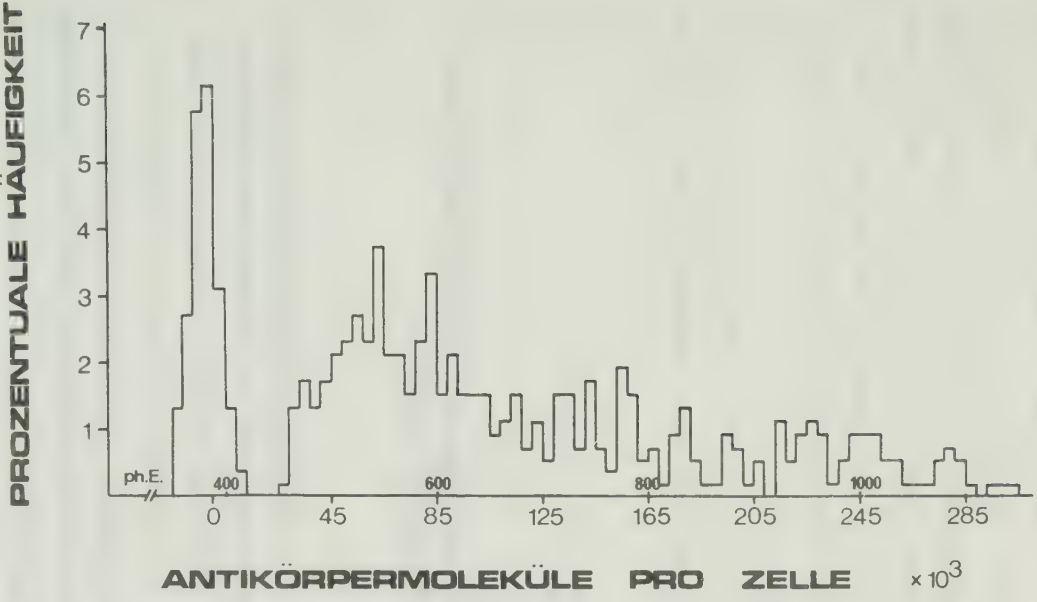

Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der photometrischen Meßwerte (ph.E.) und der Kappa-Determinantendichten markierter Lymphozyten im Blut einer Normalperson (Ja). Von 0 bis zum ersten photometrischen Meßwert repräsentiert sich die Untergrundhelligkeit dieses Autoradiogramms. Im Bereich der linken Spitze finden sich im Histogramm die Meßwerte unmarkierter Zellen.

Deutlich hebt sich die Spitze der unmarkierten Zellen zwischen den photometrischen Werten 360 und 420 heraus. Sie läßt wiederum eine Gaußsche Verteilung erkennen. Bis zum Wert 350 ist die Untergrundhelligkeit dieses Autoradiogramms repräsentiert. Ein nicht normal verteiltes Histogramm ergibt die Werte der markierten Zellen, die zwischen den Werten 450 und 1150 schwanken. Das entspricht bei Umrechnung $24x10^3$ bis $310x10^3$ AK-Moleküle/Zelle.
Eine annähernd normal verteilte Anhäufung von Meßwerten ist in dem photometrischen Meßbereich zwischen 470 und 650 zu erkennen.

9. Markierung von Lymphozyten desselben Spenders mit verschiedenen Antikörperpräparationen

In Tab. 12 wurden 8 Normalpersonen zusammengestellt, deren Lymphozyten zu verschiedenen Zeiten im Versuchsprogramm mit unterschiedlichen Antiseren inkubiert worden sind. Aus der Gegenüberstellung der Absolutwerte läßt sich ersehen, daß von dem Antikörper IgG-anti IgM deutlich mehr Moleküle an eine Zelle gebunden worden sind als mit dem $F(ab')_2$-anti IgM-Antikörper. Für den ersten Fall ist die Bindung an Fc-Rezeptoren zusätzlich zu vermuten.
Die in 2 Fällen bestimmten Werte für $F(ab')_2$-anti k-Antiseren ergeben keine großen Unterschiede zu den mit $F(ab')_2$-anti IgM erzielten Ergebnissen.

Tab. 12: Markierung desselben Spenders mit verschiedenen Antikörperpräparationen

Spender	IgG-anti IgM	$F(ab')_2$-anti IgM	$F(ab')_2$-anti k
1. Sc	194 ± 70	129 ± 79	n. b.
2. Re	210 ± 60	135 ± 86	n. b.
3. Ho	205 ± 83	162 ± 80	n. b.
4. Tr	173 ± 55	113 ± 60	n. b.
5. Ja	199 ± 56	110 ± 44	115 ± 27
6. Ka	150 ± 66	140 ± 47	n. b.
7. Ju	185 ± 43	154 ± 54	n. b.
8. De	n. b.	91 ± 27	101 ± 27

n. b. = nicht bestimmt

10. Untersuchungen an Lymphozyten des Blutes von über 60-jährigen Spendern

Um eine mögliche Veränderung der Rezeptorbesetzung der Lymphozytenmembran im Alter festzustellen, wurden von 5 Testpersonen im Alter zwischen 60 und 82 Jahren Blut in der gleichen Weise untersucht wie bei jüngeren Testpersonen. Von der Herstellung der Lymphozytensuspension bis zur Auswertung der Autoradio-

gramme wurde dabei nichts im Versuchsablauf geändert. Von sämtlichen Testpersonen war zudem bekannt, daß sie an keiner hämatologisch-immunologischen Erkrankung litten.
Im ersten Teil der Versuche wurden die Lymphozyten mit dem Antiserum $F(ab')_2$-anti IgM inkubiert. Dabei zeigte sich (Tab. 13 a), daß im Durchschnitt deutlich mehr, nämlich 205 000 (183-237 000) Antikörpermoleküle pro Zelle gebunden wurden. Bei jungen Normalpersonen waren es jedoch nur 126 000 im Durchschnitt (Tab. 9). Mit dem Wilcoxon-Test konnte nachgewiesen werden, daß sich dabei beide Kollektive signifikant unterscheiden (die Wahrscheinlichkeit, daß sie sich nicht unterscheiden, ist $<0{,}001$).
Ein ähnliches Ergebnis konnte mit dem Antiserum $F(ab')_2$-anti k erzielt werden (Tab. 13 b). Mit durchschnittlich 210 000 (160-264 000) Antikörpermolekülen pro Zelle wurden deutlich mehr gebunden als bei den jungen Testpersonen, bei denen im Durchschnitt nur 119 000 Moleküle auf einem Lymphozyten festgestellt werden konnten (Tab. 11). Mit dem Wilcoxon-Test konnte dieser signifikante Unterschied auch in diesem Falle deutlich gemacht werden.
Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, daß sich beide Kollektive nicht voneinander unterscheiden, wiederum $<0{,}001$. Dagegen ist, mit dem Wilcoxon-Test berechnet, die Wahrscheinlichkeit, daß sich zwei alte Testpersonen in ihren Ergebnissen unterscheiden, $<0{,}001$, d. h. es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Resultaten alter Spender verglichen untereinander, wohl aber verglichen zu jungen Spendern. Ein ebenso deutlicher Unterschied zwischen alten und jungen Testpersonen ergab sich in der Zahl der markierten Zellen.

Tab. 13: Spender über 60 Jahre

a) Antikörper $F(ab')_2$-anti IgM:

Spender	Alter	% markierte Zellen	IgM-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Iw	60	8	200 ± 55
2. Wi	82	2	183 ± 58
3. Bo	66	5	201 ± 32
4. Hä	68	2	237 ± 62
Durchschnitt		4 ± 3	205 ± 23

b) Antikörper $F(ab')_2$-anti k:

Spender	Alter	% markierte Zellen	Ig-Determinanten/Zelle $x10^3$
1. Iw	60	3	206 ± 49
2. Wi	82	9	224 ± 57
3. Bo	66	2	198 ± 70
4. Hä	68	8	160 ± 33
5. Es	73	2	264 ± 75
Durchschnitt		5 ± 3	210 ± 38

Mit dem Antikörper $F(ab')_2$-anti IgM konnten durchschnittlich nur 4 (2-8) % der Lymphozyten markiert werden, während es bei jungen Normalpersonen 16 % waren (Tab. 9). Mit dem t-Test konnte gezeigt werden, daß die Wahrscheinlichkeit, daß sich beide Werte nicht unterscheiden, $<0{,}0005$ ist.
Auch mit dem Antikörper $F(ab')_2$-anti k wurde dieser Unterschied deutlich. Während durchschnittlich 14 % der Lymphozyten von jungen Spendern markiert waren (siehe Tab. 11), wurden bei alten Personen nur 5 (2-9) % der Lymphozyten markiert. Im t-Test ergab sich wiederum ein Wert von $p < 0{,}0005$.

c) Histogramm der Markierungsdichte von Lymphozyten eines alten Spenders (Hä, 68 Jahre) nach Markierung mit $F(ab')_2$-anti k

Die photometrischen Meßwerte von 100 unmarkierten und 400 mit dem Antikörper $F(ab')_2$-anti k markierten Zellen eines alten Spenders (Hä, 68 Jahre), wurden in Abb. 5 histographisch nach Häufigkeit aufgetragen. Deutlich hebt sich wiederum die Spitze der unmarkierten Zellen zwischen den Werten 220 und 290 von der weiten Streuung der markierten Zellen zwischen 320 und 890 ab. Bei Umrechnung ergeben sich Ig-Determinantenzahlen pro Zelle von 31×10^3 bis 303×10^3, die auch hier die breite Streuung der Immunglobulindichte auf den Zelloberflächen deutlich werden lassen. Die Spannweite der Werte entspricht somit den Werten von jungen Spendern (siehe IV. 8b); allerdings erscheint das Häufigkeitsmaximum nach rechts verschoben entsprechend der durchschnittlich höheren Dichte der Mehrzahl der Lymphozyten.

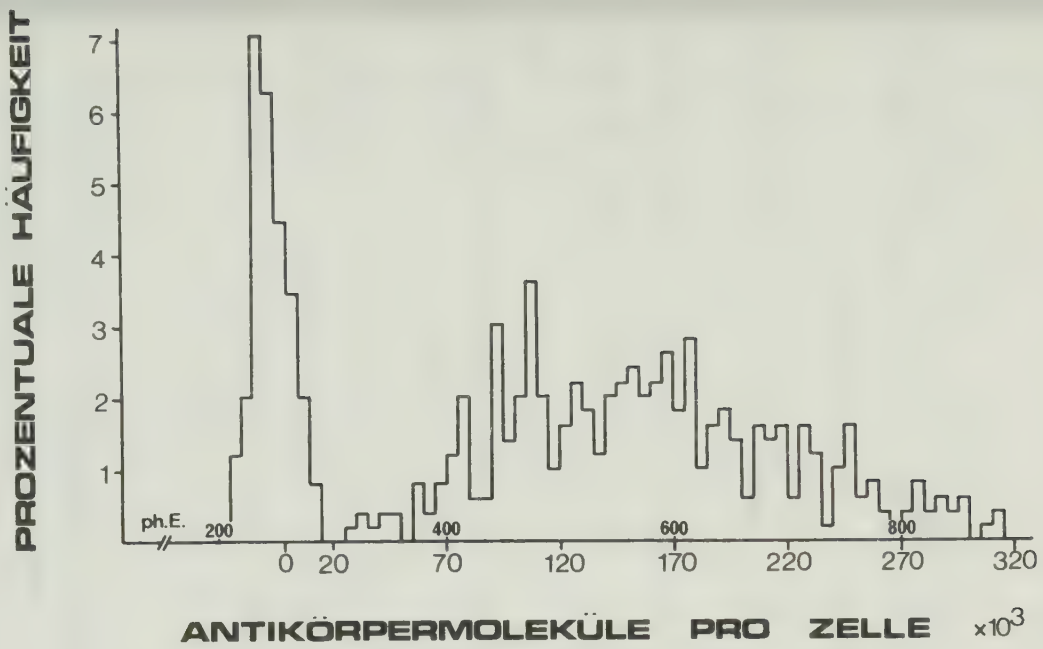

Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der photometrischen Meßwerte (ph. E.) und der Kappa-Determinantendichten markierter Lymphozyten im Blut eines alten Spenders (Hä, 68 Jahre). Von 0 bis zum ersten photometrischen Meßwert repräsentiert sich die Untergrundhelligkeit dieses Autoradiogramms. Im Bereich der linken Spitze finden sich im Histogramm die Meßwerte unmarkierter Zellen.

11. Untersuchungen der Immunglobulindeterminanten auf stimulierten Zellen

Durch eine in-vitro-Inkubation von 3 Tagen mit Protein A, ATG, PHA, Con A oder PWM wurden Lymphozyten aus dem Blut gesunder Spender in blastenähnliche Zellen umgewandelt.
Die stimulierte Zellsuspension wurde in der üblichen Weise mit radiojodinierten anti-Immunglobulinantikörpern inkubiert und autoradiographiert.
Von den normalen menschlichen Lymphozyten ist bekannt, daß ihr Durchmesser zwischen 6 und 7,3 µm schwankt. So gaben Kristenson (51) 6 µm, Marshall und Roberts (59) 6,7 µm, Zucker und Cassen (105) 7,3 µm, Humphries und Miller (44) 7,2 µm und Thom (98) 6,9 µm an. In den vorliegenden Versuchen wurde von 250 gemessenen Zellen eine Durchschnittsgröße von 7,2 µm im Durchmesser errechnet.
Auf sämtlichen Autoradiogrammen waren die nicht stimulierten Zellen unmarkiert geblieben. Von den stimulierten Zellen, die deutlich größer waren, konnte jedoch immer nur ein Teil mit dem ^{125}J-markierten Antiserum markiert werden.

a) Zur Untersuchung mit Protein A von Staphylococcus aureus (27) stimulierten Lymphozyten wurden als Antikörper sowohl IgG-anti IgM als auch $F(ab')_2$-anti IgM zur Markierung der Oberflächenimmunglobuline verwendet. Nach Forsgren (32) stellt Protein A ein Mitogen für menschliche B-Lymphozyten

Stimulans	Antikörper	% markierte stimul. Zellen	Ig-Determinanten/Zelle $x10^3$	Zellgröße (µm) stimul. Z.	nicht stimul. Z.
1. Protein A	IgG-anti IgM	10	21 ± 14	13,2	7,1
2. "	"	14	29 ± 10	13,3	7,1
3. "	$F(ab')_2$-anti IgM	16	37 ± 13	11,6	7,6
4. "	"	8	37 ± 9	10,7	7,1
5. "	"	10	40 ± 29	11,6	6,8
6. ATG	IgG-anti IgM	12	108 ± 17	10,9	7,1
7. "	$F(ab')_2$-anti IgM	18	96 ± 36	11,9	7,1
8. "	"	20	88 ± 29	11,9	7,8
9. "	"	10	92 ± 40	11,2	7,5
10. "	"	10	102 ± 61	11,5	7,3
11. "	"	15	100 ± 34	11,5	7,2
12. PHA	"	0	-	12,8	7,2
13. Con A	"	0	-	12,0	7,6
14. PWM	"	0	-	12,1	6,9

Tab. 14: Versuche mit stimulierten Zellen

dar. Hiernach wäre anzunehmen, daß es sich bei den nicht stimulierten und auch unmarkiert gebliebenen Lymphozyten um T-Zellen handeln könnte. In zwei Versuchsansätzen mit dem Antikörper IgG-anti IgM konnten im Sättigungsbereich 10 % bzw. 14 % der stimulierten Zellen markiert werden. Diese Zellen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 13,2 bzw. 13,3 µm. Mit dem üblichen Rechenansatz konnten 21 000 bzw. 29 000 Antikörpermoleküle auf der Oberfläche einer stimulierten Zelle nachgewiesen werden. Gegenüber dem Durchschnittswert von 187 000 aus 8 Versuchen bei normalen, nicht stimulierten Lymphozyten liegen diese Werte deutlich niedriger.
Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich auch bei der Verwendung von $F(ab')_2$-anti IgM als Antikörper. Bei einer durchschnittlichen Markierung von 8-16 % der stimulierten Zellen fanden sich nur zwischen 37 000 und 40 000 Antikörpermoleküle an eine Blastenzelle gebunden, während es bei normalen B-Zellen im Durchschnitt von 10 Versuchen 126 000 waren. Die Blasten hatten einen Durchmesser von 10,7 bzw. 11,6 µm.

b) Die Zellen, die mit ATG stimuliert wurden, erreichten in 6 Versuchen eine Durchschnittsgröße von 11,5 µm. In einem Versuchsansatz wurde der Antikörper IgG-anti IgM verwendet. Im Sättigungsbereich konnten 12 % der stimulierten Zellen markiert werden, die 108 000 Antikörpermoleküle pro Zelle gebunden hatten.

Bei Inkubation der Zellsuspension mit dem $F(ab')_2$-anti IgM-Antiserum wurden zwischen 10 und 20 % der Blasten markiert. 95 000 (88-102 000) Antikörpermoleküle waren dabei auf einer Blastenzelle zu finden. Im Durchschnitt von 10 Versuchen waren auf normalen B-Lymphozyten 126 000 Moleküle gebunden (siehe Tab. 9), Spender mit 91 000 bis 116 000 Molekülen als Mittelwerte waren jedoch auch 5 angetroffen worden,ein statistisch signifikanter Unterschied ist nicht anzunehmen.

c) In Zellsuspensionen, die mit den Mitogenen PHA, Con A bzw. PWM stimuliert worden waren, konnte keine stimulierte Zelle, die gleichzeitig auch markiert war, gefunden werden. Die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten Zellen erreichten eine Durchschnittsgröße von 12,8 µm. Ein ähnlicher Wert wurde auch von Marshall und Roberts (59) mit 12,0 µm angegeben. Mit Concanavalin A, bzw. Pokeweed-Mitogen stimulierte Zellen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 12,0 bzw. 12,1 µm.

V. DISKUSSION

Durch die methodischen Entwicklungen von Thiel et al. (95, 96, 97) waren die Voraussetzungen gegeben, mit der Technik der mikrophotometrischen Immunautoradiographie quantitative und qualitative Messungen von Immunglobulindeterminanten auf einzelnen menschlichen Blutlymphozyten durchzuführen. Da es sich bei den vorliegenden Experimenten um die Bestimmung von Antikörpermengen bzw. der Anzahl antigener Determinanten handelte, war es von wesentlicher Bedeutung, zuerst den Sättigungsbereich zu erfassen, in dem gewährleistet war, daß eine ausreichende Anzahl der jeweiligen Antikörpermoleküle zur Verfügung stand, um die vorhandenen antigenen Bindungsstellen vollständig absättigen zu können. Dies war für unsere Experimente bei einer Antikörperkonzentration von 16 bis 30 µg/ml erreicht (siehe IV. 1.). Der Konzentrationsbereich ähnelt dem von Jensenius und Williams (46) gefundenen Wert von 20 µg/ml für ein für Untersuchungen von Rattenlymphozyten verwendetes anti-Immunglobulin. Auch der von Hunt (45) mit anti-Fab-Antikörpern ebenfalls bei Ratten ermittelte Wert von 10 µg/ml entspricht unserem Sättigungsbereich.
Die in den vorliegenden Experimenten gewonnenen Resultate sollen im folgenden mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen werden. Besonders die mit dem Antikörper IgG-anti IgG erhaltene durchschnittliche Rezeptorzahl von 266 000 Molekülen (Tab. 6) erfordert eine eingehendere Betrachtung.

Diese Zahl liegt wohl deshalb so hoch, weil sich das Antiserum nicht monospezifisch für die Determinanten der Schweren Ketten eines eventuell vorhandenen IgG-Rezeptormoleküls erwies, sondern mittels der Leichtkettenaktivität eine polyvalente Kreuzreaktivität besaß. Da nach Knapp (50), Rowe (84) und Kunkel (52) die Primärrezeptormoleküle IgM und IgD sind, welche zumeist zugleich auf einem Lymphozyten ausgeprägt sind, konnte das "anti IgG" über eine Reaktion mit deren Leichtketten sowohl an IgM als auch an IgD gebunden werden. Vergleichbare Werte anderer Autoren wurden mit anderen Methoden (Radioimmunoassay, Peroxidasemarkierung) und überwiegend an Lymphozyten von Versuchstieren (Mäusen, Ratten) ermittelt. So fanden Lerner (53) 180 000, Unanue (100) 50-150 000, Nossal und Ada (67) 100 000 Ig-Oberflächenmoleküle bei Mäuselymphozyten und Ternyck (94) 90 000 Moleküle bei menschlichen Lymphozyten.

Die mit dem IgG-anti IgG-Antiserum erzielte Markierung von durchschnittlich 15 (7-25) % der Lymphozyten (Tab. 6) liegt dagegen unter der von einigen Autoren ebenfalls mit polyvalenten Antikörpern gefundenen Werten, welche zumeist mittels Immunfluoreszenztechniken ermittelt wurden. So fanden Grey (39) 27 %, Papamichail (72) 29 %, Cooper und Lawton (18) 32 %, Gajl-Peczalska (36) 30 % und schließlich Aiuti (6) 21 % Ig-Rezeptor tragende Lymphozyten. Demgegenüber entsprechen die von Nicod (65) und Abdou (2) angegebenen Werte von 15,3 und 17 % den hier gefundenen.

Um die unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren zu verhindern

(46, 104), verwendeten einige Autoren Antikörper, die nur noch aus dem $F(ab')_2$-Spaltprodukt des IgG Moleküls bestanden und deshalb keinen Fc-Teil mehr trugen (33, 52, 73, 104). So fanden Fröland und Natvig (33) nur noch 10 %, Kunkel (52) 7%, Winchester (104) 4,8 % und schließlich Pepys (73) nur noch 2,3 % immunglobulintragende Lymphozyten insgesamt. Um diese großen Ergebnisunterschiede zu erklären, vermutete Lobo (55) zwei Populationen von Ig-tragenden Lymphozyten: die einen mit oberflächenstabilen Ig-Determinanten (11 %), die anderen, die einen Teil ihrer Marker verlieren (21 %). Letztere Population trägt IgG in der Membran, welches über den Fc-Rezeptor aus dem Serum gebunden wurde, ohne von der Zelle gebildet worden zu sein.

In diesem Zusammenhang scheint auch eine zeitliche Schwankung der Menge der Ig-tragenden Zellen und der Rezeptordichte interessant. Lerner (54), Loor (56) sowie Vitetta und Uhr (101) fanden diesbezüglich bei Versuchen mit Mäuselymphozyten, daß die Oberflächenimmunglobuline mit einer Halbwertszeit von 1 bis 8 Stunden umgesetzt werden. Nossal und Ada (67) und Uhr und Vitetta gaben für Humanlymphozyten einen ähnlichen Wert von 6 bis 8 Stunden an. Das würde bedeuten, daß bei den Versuchen, in denen Lymphozyten gleicher Spender zu verschiedenen Zeitpunkten markiert worden waren (siehe IV. 5 b), stets eine neue Generation von Oberflächenrezeptoren markiert worden war. Da jedoch für dieselbe Testperson stets eine ähnliche Anzahl von Antikörpermolekülen an einer Zelle gebunden wurde (Tab. 7), kann man annehmen, daß die Rezeptordichte, abgesehen von einer gewissen statistischen Streuung ,

konstant gehalten wird. Dies trifft in gleicher Weise für die Anzahl der markierten Zellen zu.
Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß Zellen, die aus versuchstechnischen Gründen über einige Tage tiefgefroren gelagert werden, ebenfalls keine Veränderung erleiden hinsichtlich Markierungsanzahl und Rezeptordichte (Tab. 7).

Deutlich weniger Ig-Determinanten waren mit dem anti IgM--Antiserum nachzuweisen. Gegenüber dem polyspezifischen anti IgG war es monospezifisch für die IgM-Rezeptoren. Die in 8 Versuchsansätzen erhaltene durchschnittliche Rezeptordichte von 187 ooo Molekülen (Tab. 8) liegt im selben Bereich, den auch Hütteroth et al. (42) mit einer Radioimmunmethode ermittelten. Sie fanden 100 000 - 450 000 IgM-Moleküle auf kultivierten menschlichen Lymphozyten. Bei der in unseren Versuchen erzielten hohen Durchschnittsmarkierung von 22 % ist zu bedenken, daß eine Fc -haltige IgG-Präparation des Antikörpers verwendet worden war, was eine unspezifische zusätzliche Bindung an Fc-Rezeptoren der Zellmembran (52) möglich machte.

Um in weiteren Experimenten diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die Bindung eines $F(ab')_2$-Fragmentes des anti-IgM--Antikörpers untersucht. Mit durchschnittlich 16 % (Tab.9) waren mit dem $F(ab')_2$-anti IgM-Antikörper auch deutlich weniger Lymphozyten markiert als im Versuch mit dem IgG-anti IgM-Antikörper. Trotzdem liegt dieser Wert noch über denen anderer Forschergruppen, die hauptsächlich mit fluoreszenz-

farbstoffmarkierten Antiseren arbeiteten: Fröland und Natvig (33) 6 %, Grey (39) 8 %, Pernis (75) 9,3 %, Papamichail (72) 7 %, Cooper (19) 8,9 %, Nicod (65) 8,2 %, Aiuti (6) 8,9 %, Winchester (104) 6,7 %, Abdou (2) 6 % und Pepys (73) 8,1 %. Lediglich die Werte von Preud'homme und Seligmann (77) sowie von Stein und Drescher (91) lagen mit 13 und 11 % in unserem Streubereich von 10 bis 22 %.

Auch die durchschnittliche Zahl der IgM-Determinanten lag mit 126 000 (Tab. 9) deutlich unter dem Wert von 187 000, der mit dem kompletten Antikörper bestimmt wurde (Tab. 8). Andere Autoren (45, 46) fanden, allerdings bei Rattenlymphozyten, 20 - 150 000 bzw. 8 - 60 000 IgM-Moleküle pro Zelle gebunden. Der Unterschied zwischen der Bindung von Fragment und komplettem Antikörpermolekül wird deutlich, wenn man die Einzelergebnisse der Tabellen 8 und 9 vergleicht, wo 8 Normalpersonen sowohl mit IgG-anti IgM als auch mit $F(ab')_2$-anti IgM getestet worden waren. Bei 7 Spendern resultiert eine eindeutig geringere Anzahl an IgM-tragenden Lymphozyten und eine geringere Dichte an IgM-Determinanten bei Verwendung des Antikörperfragmentes. Lediglich bei der Normalperson "Ju" sind mit beiden Antiseren gleichviel markierte Zellen gemessen worden; die IgM- Determinantendichten unterschieden sich jedoch auch in diesem Fall.

Auch für die Ergebnisse mit dem $F(ab')_2$-anti IgM-Antiserum konnte statistisch nachgewiesen werden, daß gesunde Normalpersonen zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten auf ihren peripheren Lymphozyten Rezeptordichten haben, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dasselbe gilt

für die Zahl der rezeptortragenden Zellen (Tab. 10).

Mit dem Antikörper anti kappa wurden spezifisch die kappa-Leichtketten sämtlicher Membranimmunglobuline markiert. Ternyck (94) wies mit der Peroxidasemethode 86 - 185 000 Kappaketten von Immunglobulinen auf menschlichen Lymphozyten nach. Wir konnten mit der autoradiographischen Methode einen Durchschnittswert aus 5 Versuchen von 119 000 kappa-Determinanten erhalten bei einer nur geringen Streubreite des Mittelwertes von $\pm$13 000 (Tab. 11).
Eine gute Korrelation mit anderen Autoren besteht auch in der Zahl der markierten Zellen, die bei uns durchschnittlich 14 % betrug. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode fanden Nicod (65) 20,4 %, Aiuti (6) 13,9 % und Abdou (2) 15 % kappa-positive Zellen. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß jede Zelle nur einen Leicht-Kettentyp synthetisiert, auch in den Fällen, wo IgM und IgD auf der Membran einer Zelle exprimiert werden (4, 85). Somit ist eine in unseren Untersuchungen offen gebliebene Anzahl lambda-positiver Zellen zu addieren, um die Gesamtzahl der Ig-positiven Zellen zu ermitteln.

Einen zusammenfassenden Überblick über die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse mit verschiedenen Antiseren gibt Tab.12. Dort sind durchschnittliche Ig-Determinantendichten von 8 Normalpersonen zusammengestellt, an deren Lymphozyten die Bindung von 3 verschiedenen Antikörpern untersucht worden ist. Während die Werte mit dem Antikörper IgG-anti IgM deutlich

von denen mit $F(ab')_2$-anti IgM und $F(ab')_2$anti k differieren, ist zwischen den beiden letztgenannten kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Diese Tatsache wird auch bestätigt, wenn man den Durchschnittswert aus den Versuchen mit $F(ab')_2$-anti IgM von 126 000 Ig-Detreminanten pro Zelle (Tab. 9) mit dem Wert von 119 000 Rezeptoren pro Zelle für $F(ab')_2$-anti k (Tab. 11) vergleicht. Auch die durchschnittlichen Prozentsätze an markierten Zellen waren mit 16 % (Tab. 9) und 14 % (Tab. 11) in ähnlicher Größenordnung.
Ebenfalls entsprechende Resultate ergaben sich bei der Untersuchung der Lymphozyten von Spendern über 60 Jahren, wobei sich bei Verwendung der IgM- und kappa-spezifischen Antikörperfragmente ein einheitliches Resultat, nämlich gleichermaßen eine Verminderung der markierten Lymphozyten und eine entsprechende Vermehrung der Rezeptoren pro Zelle, ergab.
Somit waren mit den Antikörpern $F(ab')_2$-anti IgM und $F(ab')_2$-anti k etwa gleichviele Ig-Determinanten pro Zelloberfläche markierbar und etwa gleichviele rezeptortragende Zellen im peripheren Blut erkennbar.
Daß die Determinantendichte (μ oder k) gleich ist, bestätigt, daß pro Zelle tatsächlich nur ein Leichtkettentyp exprimiert wird. Anscheinend ist dabei die Anzahl der von beiden Seren erkennbaren Determinanten pro membrangebundenes IgM-Molekül gleich, egal ob der Anti-Schwere-Ketten- oder der Anti-Leicht-Ketten-Antikörper verwendet wurde.

Eventuelle Veränderungen von Rezeptordichte und Anzahl rezeptortragender Lymphozyten im Alter sind bisher nur wenig un-

tersucht worden. Währen Cohnen (16) feststellte, daß der Prozentsatz der markierten Zellen im Alter gleich bleibt und nur die absolute Zahl abnimmt, ergab sich bei unseren Versuchen, daß prozentual weniger Lymphozyten mit anti-Immunglobulin-Antikörpern markiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß diese jedoch mehr Rezeptoren an ihrer Oberfläche tragen. So wurde bei Verwendung sowohl des $F(ab')_2$-anti IgM als auch des $F(ab')_2$-anti k Antiserums im Durchschnitt etwas mehr als das 1 1/2 fache der normalen durchschnittlichen Ig-Determinantenzahl errechnet, während durchschnittlich 1/4 bzw. 1/5 weniger Zellen rezeptortragend waren. Es konnte gezeigt werden, daß diese Unterschiede statistisch hoch signifikant sind. Vergleicht man dazu die beiden Leichtketten-Histogramme (Abb. 4 und 5) miteinander, so ist bei der jüngeren Normalperson deutlich zu erkennen, daß sich der größte Teil der markierten Zellen in einem Bereich findet, der eine niedrige Rezeptordichte repräsentiert. Im Histogramm der älteren Person ist die größere Zahl der Zellen im Bereich höherer Rezeptordichte konzentriert. Eine höhere Ig-Dichte mag unreifen B-Zellen entsprechen, wie von Fu et al. (35) beim Studium von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie nachgewiesen wurde. Demzufolge sind Zellen mit geringerer Ig-Determinantendichte in Richtung Plasmazelle differenziert. Eine Klärung dieses Phänomens muß jedoch weiteren eingehenderen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Bei der autoradiographischen Untersuchung stimulierter Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Normalpersonen war es mög-

lich, neben der absoluten Ig-Determinantenzahl pro Zelloberfläche auch die Zellgröße genau zu bestimmen (Tab. 14). Damit konnte gezeigt werden, daß sich bei ATG-stimulierten B-Lymphozyten die Ig-Determinantenzahl pro Zelle nicht signifikant verringert hatte, jedoch eine deutliche Verminderung der Ig-Dichte pro Membranareal eingetreten war. Bei Zellen, die mit Protein A stimuliert waren, war neben der Ig-Dichte auch die Ig-Determinantenzahl insgesamt deutlich verringert.
Bei während 3 Tagen mit PHA, Con A und PWM stimulierten Lymphozyten waren keine Ig-tragenden Zellen nachweisbar. Entweder kam es durch die Stimulation zu einer ausschließlichen Proliferation von nicht Ig-tragenden Lymphozyten (wohl überwiegend T-Zellen), oder aber die stimulierten B-Lymphozyten hatten keine nachweisbaren Immunglobulindeterminanten mehr. Letzteres könnte damit zusammenhängen, daß sie sich in Richtung Plasmazellen differenziert haben und somit kein membrangebundenes Immunglobulin sondern nur noch cytoplasmatisches Immunglobulin bilden (78). Eine Abnahme von Ig-Rezeptoren während der weiteren Differenzierung wurde auch von Nossal et al. (68) bei Mäuse-B-Zellen nachgewiesen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Methode der mikrophotometrischen ^{125}J-Immunautoradiographie wurde nach Ermittlung einer immunologischen Sättigungskonzentration die Anzahl von Immunglobulindeterminanten auf B-Lymphozyten von Normalpersonen quantitativ gemessen. Dazu wurden verschiedene ^{125}J-markierte Antikörper definierter Spezifität verwendet. Referenzquellen waren membranmarkierte Human-Erythrozyten.

Mit einem polyspezifischen Antiserum wurden durchschnittlich 15 % rezeptortragende Lymphozyten im peripheren Blut gefunden, die im Durchschnitt 266 000 Immunglobulindeterminanten an der Zellmembran trugen.

Bei Verwendung eines für IgM monospezifischen Antiserums waren durchschnittlich 16 % der Lymphozyten markiert, wobei eine Immunzelle durchschnittlich 126 000 IgM-Rezeptormoleküle an ihrer Oberfläche hatte.

Bei einer vergleichenden Untersuchung konnte eine unterschiedliche Bindung des Antikörperfragmentes verglichen zum kompletten Antikörper an einzelne Lymphozyten nachgewiesen werden, obwohl dasselbe IgM-spezifische Antiserum verwendet wurde. Als mögliche Ursache hierfür wurde eine unspezifische Bindung des kompletten Antikörpermoleküls über Fc-Rezeptoren der Zellen diskutiert.

Mit einem für Kappa-Leichtketten spezifischen Antiserum wurden 14 % Lymphozyten markiert. Rund 119 000 Anti-Kappa-Moleküle waren auf einer Zelle nachweisbar.

Ein deutlicher, signifikanter Unterschied zwischen jungen Normalpersonen und Spendern über 60 Jahren konnte hinsichtlich der Zahl rezeptortragender Zellen und der Immunglobulin-Determinantendichte der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Signifikante Schwankungen der Zahl der Zellen mit Immunglobulinrezeptoren und ihrer Rezeptordichte konnten für Normalpersonen ausgeschlossen werden, wenn dieselben Spender zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurden.

Die für Normalpersonen charakteristische Verteilung der quantitativ unterschiedlich stark rezeptorbesetzten Lymphozyten wurde in Histogrammen dargestellt.

Versuche mit stimulierten Humanlymphozyten zeigten eine weitgehende Verminderung der Immunglobulindeterminanten auf den transformierten Blasten.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdou, N. I., Abdou, N. L.: Bone marrow: The bursa equivalent in man? Science 175, 446 (1972)

2. Abdou, N. L., Alavi, J. B. Abdou, N. I.: Human bone marrow lymphocytes: B and T cell precursors and subpopulations. Blood 47, 423 (1976)

3. Ada, G. L.: Antigen-binding cells in tolerance and immunity. Transplant. Rev. 5, 105 (1970)

4. Aisenberg, A. C., Bloch, K. J.: Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. New Engl. J. Med. 287, 272 (1972)

5. Aiuti, F., Lavava, V., Fiorilli, M., Ciarla, M. V.: Lymphocyte surface markers in lymphoproliferative disorders. Acta haemat. (Basel) 50, 275 (1973)

6. Aiuti, F.: Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Scand. J. Immunol. 3, 521 (1974)

7. Arens, H., Eggert, I., Heisenberg, E.: Zusammenhang zwischen Schwärzung, Silbermenge, Deckkraft, Kornzahl und Korndimension entwickelter photographischer Schichten. Z. wiss. Photogr. 28, 356 (1931)

8. Avrameas. S., Tandon, B., Chuillon, S.: Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianisidine as coupling reagents in the passive haemagglutination test. Immunochemistry 6, 67 (1969)

9. Bankhurst, A., Warner, N. L.: Surface immunoglobulins on mouse lymphoid cells. J. Immunol. 107, 368 (1971)

10. Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Bouthillier, Y. Decreusefond. C.: Morphology and differentiation of rosette-forming cells during the immune response. Transplant. Proc. 4, 339 (1972)

11. Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 97 (1968)

12. Bothe, W.: Über photographische β-Strahlenmessung. Z. Phys. 8, 243 (1922)

13. Boxel, J. A., van, Paul., W. E., Terry, W. D., Green, I.: IgD bearing human lymphocytes. J. Immunol. 109, 648 (1972)

14. Byrt, P., Ada, G. L.: An in vitro reaction between labelled flagellin or hemocyanin and lymphocyte like cells from normal animals. Immunol. 17, 503 (1969)

15. Chruchaud, S., Frei, P. C.: Demonstration of specific antibodies on human circulating lymphocytes by a new technique. Int. Arch. Allergy 31, 455 (1967)

16. Cohnen, G., Augener, W., Reuter, A., Brittinger, G.: Peripheral blood T and B lymphocytes in men in different age groups. Z. Immun. Forsch. 149, 463 (1975)

17. Coombs, R. R. A., Gurner, B. W., Janeway, C. A., Wilson, A. B., Gell, P. G. H., Kelus, A. S.: Immunoglobulin determinants on the lymphocytes of normal rabbits. I. Demonstration by the mixed antiglobulin reaction of determinants recognized by anti-γ, anti-$\mu$and anti-Fab and anti-allotype-sera, anti-As 4 and anti-As 6. Immunology 18, 417 (1970)

18. Cooper, M. D., Lawton, A. R.: Circulating B-cells in patients with immunodeficiency. Am. J. Pathol. 69, 513 (1972)

19. Cooper, A. G., Brown, M. C., Derby, H. A., Wortis, H. H.: Quantitation of surface-membrane and intracellular gamma, mμ and kappa chains of normal and neoplastic human lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 13, 487 (1973)

20. Davie, J. M., Rosenthal, A. S., Paul, W. E.: Rezeptors on immunocompetent cells. III. Specifity and nature of receptors on dinitrophenylated guinea pig albumin ^{125}J-binding cells of immunized guinea pigs. J. Exp. Med. 134, 517 (1971)

21. Dörmer, P., Brinkmann, W., Stieber, A., Stich, W.: Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-Autoradiographie. Klin. Wschr. 44, 477 (1966)

22. Dörmer, P.: Erfahrung mit der photometrischen Silberkornzählung in der Autoradiographie. Leitz, Mitt. Wiss. u. Techn., Bd. IV, 3, 74, Wetzlar 1967

23. Dörmer, P., Brinkmann, W.: Quantitative ^{14}C-Autoradiographie einzelner Zellen. Histochemie 29, 248 (1972)

24. Dörmer, P.: Photometric methods in quantitative autoradiography. In: U. Lüttge (ed.), Microautoradiography and electron probe analysis. p. 7., Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972

25. Dörmer, P.: Quantitative autoradiography at the cellular level. Micromethods in Molecular Biology (Ed. by V. Neuhoff) p. 347, Springer, Berlin 1973

26. Dörmer, P.: Auflicht-Hellfeld-Photometrie in der quantitativen Autoradiographie: Entwicklungen zur Automatisation. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn., Bd. VI, 3, 81, Wetzlar 1974

27. Dorval, G., Welsh, K. I., Wigzell, H.: A radioimmunoassay of cellular surface antigens on living cells using iodinated soluble protein A from Staphylococcus Aureus. Journal of Immunol. Methods 7, 237 (1975)

28. Ehrlich, P.: Croonian lecture. On immunity with special reference to cell life. Proc. roy. Soc. 66, 424 (1900)

29. Edelmann, G. M., Poulik, M. D.: Studies on structural units of the -globulins. J. Exp. Med. 113, 861 (1961)

30. Elliott, B. E., Haskill, J. S.: Characterization of thymus-derived and bone marrow-derived rosette-forming lymphocytes. Europ. J. Immunol. 3, 68 (1973)

31. Ertl, H. H.: Dosimetrie von inkorporiertem Tritium und Jod-125. Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, Nr. 688, 1970

32. Forsgren, A., Svedjelund, A., Wigzell, A.: Lymphozyte stimulation by protein A of Staphylococcus Aureus. Eur. J. Immunol. 6, 207 (1976)

33. Fröland, S., Natvig, J. B.: Surface-bound immunoglobulin as a marker of B-lymphocytes in man. Nature New Biology, 234,251 (1971)

34. Fröland, S., Natvig, J. B.: Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers. Transplant. Rev. 16, 114 (1973)

35. Fu, S. M., Winchester, R. J., Kunkel, H. G.: Similar idiotypic specifity for the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes. J. Immunol. 114, 250 (1975)

36. Gajl-Peczalska, K. J., Park, B. H., Biggar, W. D., Good, R. A.: B and T lymphocytes in primary immunodeficiency disease in man. J. Clin. Invest. 52, 919 (1973)

37. Goldstein, D. J., Williams, M. A.: Use of polarized light in the quantitative analysis of autoradiographs with the reflectance microscope. Proc. R. microsc. Soc. 6, 142 (1971)

38. Greenwood, F. C., Hunter, W. M., Glover, J. S.: The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89, 114 (1963)

39. Grey, H. M., Rabellino, E., Pirofsky, B.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. J. Clin. Invest. 50, 2368 (1971)

40. Gullberg, I.E.: A new change-over optical system and a direct resording microscope for quantitative autoradiography. Exp. Cell Res., Suppl. 4, 222 (1957)

41. Huber, H., Michlmayr, G., Asamer, H., Huber, Ch., Braunsteiner, H.: Die Differenzierung menschlicher Blutlymphozyten mit immunologischen und autoradiographischen Methoden. I. Ergebnisse bei Normalpersonen und bei Patienten mit chronischer Lymphadenose. Klin. Wschr. 50, 504 (1972)

42. Hütteroth, T. H., Litwin, S. D., Lin, P. K., Cleve, H.: Membranimmunglobuline der lymphoiden Zellen etablierter menschlicher Suspensionskulturen. Z.Immun.Forsch. 147, 337 (1974)

43. Hughes, W. L.: The chemistry of iodination. Ann. N. Y. Acad. Sci. 70, 3 (1957)

44. Humphries, R. K., Miller, R. G.: Volume analysis of human peripheral blood leukocytes. Ser. Haematol. 5/2, 142 (1972)

45. Hunt, S. V., Williams, A. F.: The origin of cell surface immunoglobulin of marrow-derived and thymus-derived lymphocytes of the rat. J. Exp. Med. 139, 470 (1974)

46. Jensenius, J. C., Williams, A. F.: The binding of antibodies to rat thymocytes and thoracic duct lymphocytes. Eur. J. Immunol. 4, 91 (1974)

47. Julius, M. H., Masuda, T., Herzenberg, L. A.: Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibodyproducing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 1934 (1972)

48. Jones, G., Marcuson, E. C., Roitt, I. M.: Immunoglobulin allotypic determinants on rabbit lymphocytes. Nature 227, 1051 (1970)

49. Karnovsky, M. J., Unanue, E. R., Leventhal, M.: Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. II. Mapping of surface moities. J. Exp. Med. 136, 907 (1972)

50. Knapp, W., Bolhuis, R. L. H., Radl, J., Hijmans, W. J.: Independent movement of IgD and IgM molecules on the surface of individual lymphocytes. Immunol. 111, 1295 (1973)

51. Kristenson, A.: The variations in size (the lymphocyte profile) of the lymphocytes circulating in the blood in some normal and pathologic conditions. Acta med. Scand. 133, 157 (1949)

52. Kunkel, H. G.: Surface markers of human lymphocytes. The John Hopkins med. J. 137, 216 (1975)

53. Lerner, R., McConahey, P., Dixon, F.: Quantitative aspects of plasma membrane-associated immunoglobulin in clones of diploid human lymphocytes. Science 173, 60 (1971)

54. Lerner, R., McConahey, S. J., Jansen, J., Dixon, F. J.: Synthesis of plasma membrane-associated and secretory immunoglobulin in diploid lymphocytes. J. Exp. Med. 135, 136 (1972)

55. Lobo, P., Westervelt, F. B., Horwitz, D. A.: Identification of two populations of immunoglobulinbearing lymphocytes in men. J. Immunol. 114, 116 (1975)

56. Loor, F., Forni, L., Pernis, B.: The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors effecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins. Europ. J. Immunol. 2, 203 (1972)

57. Mann, W. B.: The preparation and maintenance of standards of radioactivity. Int. J. appl. Radiat. 1, 3 (1956)

58. Marchalonis, J. J., Cone, R. E., Atwell, J. L.: Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins. J. Exp. Med. 135, 956 (1972)

59. Marshall, W. H., Roberts, K. B.: Continuous cinematography of human lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin including observations on cell division and interphase. Quart. J. Exp. Physiol. 50, 361 (1965)

60. Mc Conahey, P. J., Dixon, F. J.: A methode of trace iodination of protein for immunology studies. Int. Arch. Allergy 29, 185 (1966)

61. Miller, A., De Luca, D., Decker, J., Ezzell, R., Sercarz, E. E.: Specific binding of antigen to lymphocytes. Evidence for lack of unispecifity in antigen-binding cells. Amer. J. Path. 65, 451 (1971)

62. Minowada, J., Moore, G. E.: T-Lymphocyte cell-lines derived from patients with acute lymphoblastic leukemia. In: Comparative Leukemia Research, p. 251 (1973) University of Tokyo Press, Tokyo/Karger, Basel, 1975

63. Modabber, F.: Antigen-binding cells of the thymus. In: Davies, A.J. S., Carter, R. L. (Eds.): Contemporary topics in Immunobiology, Volume 2: Thymus Dependency, p. 207. New York - London: Plenum Press 1973

64. Myers, W. G.: Radioiodine- 123 for medical research and diagnosis. Recent advances nucl. med. 4, 131 (1974)

65. Nicod, I., Girard, J. P., Cruchaud, A.: Membrane-associated immunoglobulins of human lymphocytes in immunologic disorders. Clin. exp. Immunol. 15, 365 (1973)

66. Nisonoff, A., Wissler, F. C., Lipmann, L. N., Woernley, D. L.: Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molekule by reduction of disulfide bonds. Arch.Biochem.Biophys. 89,230 (1960)

67. Nossal, G. J. V., Ada, G. L., Some properties of radio-autography, with special reference to Tritium and ^{125}Jodine. In: Antigens, Lymphoid cells and the Immune Response. Academic Press. Inc., New York (1971)

68. Nossal, G. J. V., Lewis, H.: Variation in assessible cell surface immunoglobulin among antibody-forming cells. J.Exp. Med. 135, 1416 (1972)

69. Nossal, G. J. V., Warner, N. L., Lewis, H., Sprent, J.: Quantitative features of a sandwich radioimmuno-labelling technique for lymphocyte surface receptors. J. Exp. Med. 135, 405 (1972)

70. Osmond, D. G., Nossal, G. J. V.: Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. I. Quantitative radioautographic studies of antiglobulin binding by lymphocytes in bone marrow and lymphoid tissues. Cell. Immunol. 13, 117 (1974)

71. Owen, J. J. T.: The origins and development of lymphocyte populations. In: Ontogeny of acquired immunity. A Ciba Foundation Symposium. Elsevier-Excerpta Medica North Holland, Amsterdam-London-New York, p. 35, 1972

72. Papamichail, M., Holborow, E. J., Keith, H. I., Currey, H. L. F.: Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. Lancet 2,64 (1972)

73. Pepys, M. B., Sategna-Guidetti, C., Mirjah, D.: Enumeration of immunoglobulin-bearing lymphocytes in whole peripheral blood. Clin. exp. Immunol. 26, 91 (1976)

74. Pernis, B., Forni, L., Amante, L.: Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. J. Exp. Med. 132, 1001 (1970)

75. Pernis, B., Forni, L., Amante, L.: Immunoglobulins as cell receptors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 190, 420 (1971)

76. Porter, R. R.: A discussion on the chemistry and biology of immunoglobulins. Proc. roy. Soc. B. 166,133 (1966)

77. Preud'homme, J. L., Seligmann, M.: Surface bound immunoglobulins as a cell marker in lymphoproliverative diseases. Blood 40, 777 (1972)

78. Preud'homme, J. L.: Loss of surface IgD by human B lymphocytes during polyclonal activation. Eur. J. Immunol. 7, 191 (1977)

79. Rabellino, E., Colon, S., Grey, H. M., Unanue, E. R.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. J. Exp. Med. 133, 156 (1971)

80. Raff, M. C., Sternberg, M., Taylor, R. B.: Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. Nature 225, 553 (1970)

81. Reif, A. E.: A simple procedure for high-efficiency radioiodination of proteins. J. Nucl. Med. 9, 148 (1969)

82. Ritts, R. E., Jr.: Autoradiography in immunological investigation. Methode in Immunology and Immunochemistry. Vol. II, 228 (1968)

83. Rogers, A. W.: A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections. Expl. Cell. Res. 24, 228 (1961)

84. Rowe, D. S., Hug, K., Forni, L., Pernis, B.: Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. J. Exp. Med. 138, 965 (1973)

85. Schmid, W.: Autoradiography of human chromosomes. In: J. J. Yunis (ed.), Human chromosome methodology p.91 New York-London: Academic Press, 1965

86. Schneider, U., Schwenk, H. U.: Characterization of EBV-genome negative "Null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed Non-Hodgkin Lymphoma. Int. J. Cancer 19, 621 (1977)

87. Seliger, H. H.: The application of standards of radioactivity. Int. J. appl. Radiat. 1, 215 (1956)

88. Seligmann, M., Preud'homme, J. L., Brouet, J. C.: B and T cell markers in human proliverative blood diseases and primary immunodeficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins. Transplant. Rev. 16, 85 (1973)

89. Sell, S., Gell, P. G. H.: Studies on rabbit lymphocytes in vitro. I. Stimulation of blast transformation with an antiallotype serum. J. Exp. Med. 122, 423 (1965)

90. Sonoda, S., Schlamowitz, M.: Studies of ^{125}J trace labelling of immunoglobulin G by chloramin-T. Immunochem. Vol. 7, 885 (1970)

91. Stein, H., Drescher, S.: Darstellung von IgM an Blutlymphozyten mit der Immuno-Peroxydase-Methode. Blut 26, 35 (1973)

92. Tanigaki, N., Miyakawa, Y., Yagi, Y., Kreiter, V. P., Pressman, D.: Radioiodinated soluble Hl-A antigens: Hl-A alloantigenic characterization and use in radioimmunoassey. J. of Immunolog. Methods 3, 109 (1973)

93. Taylor, R. B., Duffus, W. P. H., Raff, M. C., De Petris, S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti--immunoglobulin antibody. Nature New Biology 233, 185 (1971)

94. Ternyck, Z., Dighiero, G., Follezon, J., Binet, J. L.: Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxydase-labelled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants. Blood 43, 789 (1974)

95. Thiel, E., Dörmer, P., Rodt, H., Thierfelder, S.: Quantitative immunoautoradiography at the cellular level. I. Design of a micropnotometric method to quantitate membrane antigens on single cells using ^{125}J-labelled antibodies. J. Immunol. Methods 6, 317 (1975 a)

96. Thiel, E., Dörmer, P., Mulitz, M.: Quantitative ^{125}J-Autoradiographie einzelner Zellen. Histochemistry 43, 33 (1975 b)

97. Thiel, E., Dörmer, P., Ruppelt, W., Thierfelder, S.: Quantitative immunoautoradiography at the cellular level. II. Absolute measurements using labelled standard cells as a source of reference. J. Immunol. Methods 12, 237 (1976)

98. Thom, R.: Vergleichende Untersuchungen zur elektronischen Zellvolumen-Analyse. Mitt. von Telefunken z. Hochfrequenztechnik, 1972

99. Uhr, J. W., Vitetta, E. S.: Synthesis, biochemistry and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes. Fed. Proc. 32, 35 (1973)

100. Unanue, E. R., Grey, H. M., Rabellino, E., Campbell, P., Schmidke, J.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. II. The bone marrow as the main source of lymphocytes with detectable surface-bound immunoglobulins. J. Exp. Med. 133, 1188 (1971)

101. Vitetta, E. S., Uhr, J. W.: Cell surface immunoglobulin. V. Release from murine splenic lymphocytes. J. Exp. Med. 136, 676 (1972)

102. Weintraub, M., Kenneth, G., Silber, R.: The use of ^{125}J as a membrane protein label for erythrocyte survival studies. Blood 43, 549 (1974)

103. Wilson, J. D.: The relationship of antibody-forming cells to rosette-forming cells. Immunology 21, 233 (1971)

104. Winchester, R. J., Fu, S. M., Hoffman, T., Kunkel, H. G.: IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of the third cell population. J. Immunol. 114, 1210 (1975)

105. Zucker, R. M., Cassen, B.: The separation of normal human leukocytes by density and classification by size. Blood 34, 591 (1969)

VIII. LEBENSLAUF

L E M M E R Z Otto

geboren am 2. Dezember 1948 in Pöttmes/Schwaben

Eltern: Lemmerz Otto und Anny, geb. Schlicker

Volksschule in Pöttmes und Augsburg von 1955-1961

Städtische Realschule Augsburg von 1961-1965

Peutinger- und Holbein-Gymnasium Augsburg von 1965-1969

Abitur 1969

Sommersemester 1970 Beginn des Studiums der Zahnmedizin,

Wintersemester 1970 Beginn des Studiums der Medizin an der

Ludwig-Maximilian-Universität München

Zahnärztliche und ärztliche Vorprüfung 1973

Sommersemester 1976 Staatsexamen in Medizin

Wintersemester 1976 Staatsexamen in Zahnmedizin

Medizinalassistentenstellen vom Februar bis Mai 1977 an der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker, München, vom Juni bis September 1977 an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Füssen und vom Oktober 1977 bis Januar 1978 an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Seit Februar 1978 im Grundwehrdienst an der Zahnstation der Bundeswehrhochschule München